

EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL BROKOLI (*Brassica oleracea*) TERHADAP PENURUNAN KADAR *MALONDIALDEHYDE* (MDA) PLASENTA *Rattus norvegicus* BUNTING YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

Yuliani Rohmawati

NIM 155070601111002

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

JURUSAN KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL BROKOLI (*Brassica oleracea*) TERHADAP PENURUNAN KADAR *MALONDIALDEHYDE* (MDA) PLASENTA *Rattus norvegicus* BUNTING YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

Yuliani Rohmawati

NIM 155070601111002

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

JURUSAN KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR
EFEKTIVITAS PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL BROKOLI (*Brassica oleracea*) TERHADAP PENURUNAN KADAR *MALONDIALDEHYDE* (MDA) PLASENTA *Rattus norvegicus* BUNTING YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

Oleh:

Yuliani Rohmawati
NIM 155070601111002

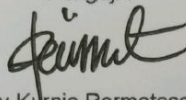
Telah diuji pada

Hari : Jum'at

Tanggal : 14 Juni 2019

dan dinyatakan lulus oleh:

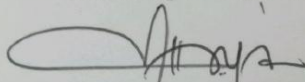
Penguji-I



dr. Happy Kurnia Permatasari, Ph.D

NIP. 2012018603182001

Pembimbing-I/ Penguji-II,



dr. Elly Mayangsari, M. Biomed

NIP. 198405162009122005

Pembimbing-II/Penguji-III,



Nur Aini Retno H, SST, M. Keb

NIK. 2018029003202001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S1 Kebidanan,



Linda Ratna Wati, SST., M. Kes

NIP. 198409132014042001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama :Yuliani Rohmawati

NIM :155070601111002

Program Studi : Program Studi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 16 Maret2019

Yang membuat pernyataan,

(Yuliani Rohmawati)

NIM. 155070601111002

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Efektivitas Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea*) Terhadap Penurunan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Plasenta *Rattus norvegicus* Bunting Yang Terpapar Asap Rokok”.

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh fakta bahwa jumlah perokok semakin meningkat, hal ini menyebabkan jumlah perokok pasif ikut meningkat termasuk disini adalah ibu hamil. Paparan asap rokok selama kehamilan dapat menyebabkan ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan pada plasenta sehingga akan menimbulkan terjadinya proses peroksidasi lipid dengan hasil akhir berupa MDA (*Malondialdehyde*). Terjadinya peroksidasi lipid pada plasenta akan berdampak pada kerusakan struktur dan fungsi plasenta. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea*) terhadap kadar MDA plasenta *Rattus norvegicus* bunting yang terpapar asap rokok.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M. Si, Med., SpA(K), dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Linda Ratna Wati, SST., M. Kes, sebagai Ketua Program Studi S1 Kebidanan yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi S1 Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3. dr. Elly Mayangsari, M. Biomed sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bantuan, yang dengan sabar memberikan bimbingan, masukan, dan saran untuk bisa menulis dengan baik serta senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Nur Aini Retno H, SST, M. Keb sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar telah membimbing penulisan dan analisis data, serta senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
5. dr. Happy Kurnia Permatasari, Ph.D sebagai Ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberikan masukan untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir.
6. Keluarga yang tak henti-hentinya memberikan dukungan, motivasi, doa, dan semangat selama menempuh kuliah dan mengerjakan Tugas Akhir.
7. Sahabat-sahabatku di S1 Kebidanan yang selalu mendukung, memotivasi dan memberikan saran serta semua pihak yang telah membantu, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis menerima setiap saran dan kritik yang bersifat membangun. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi pembaca serta semua pihak yang membutuhkan.

Malang, 30 Agustus 2018

Penulis

ABSTRAK

Rohmawati, Yuliani. 2019. **Efektivitas Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea*) Terhadap Penurunan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Plasenta *Rattus norvegicus* Bunting Yang Terpapar Asap Rokok**. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Elly Mayangsari, M. Biomed, (2) Nur Aini Retno, SST, M. Keb.

Di dalam asap rokok terdapat banyak radikal bebas yang berbahaya bagi ibu hamil. Paparan asap rokok selama kehamilan mengakibatkan stres oksidatif dan peroksidasi lipid plasenta dengan hasil akhir *Malondialdehyde* (MDA). Terjadinya peroksidasi lipid plasenta menyebabkan kerusakan sel endotel plasenta. Brokoli mengandung senyawa antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas sehinggamenencegah terjadinya stres oksidatif. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek ekstrak etanol brokoli pada kadar MDA plasenta tikus bunting yang terpapar asap rokok. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design* dengan menggunakan tikus bunting. Sampel terbagi dalam 2 kelompok kontrol (K (-)=tanpa perlakuan, K (+)=dipapar asap rokok) dan 3 kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok serta ekstrak etanol brokoli dengan dosis berbeda (P1=100, P2=200, P3=400 mg/kgBB/hari). Pemberian ekstrak etanol brokoli dimulai hari ke 1-19 kebuntingan sedangkan paparan asap rokok dimulai hari ke 7-19 kebuntingan. Hasil uji One Way ANOVA didapatkan adanya perbedaan antar kelompok ($p=0,000$). Pada analisa Tukey HSD, hasil perbandingan K (+) dengan P1, P2, dan P3 diperoleh $p = 0,000$ yang berarti ada perbedaan secara bermakna. Uji korelasi *Pearson* menunjukkan arah hubungan negatif yang berarti semakin besar ekstrak etanol brokoli yang diberikan, semakin rendah kadar MDA plasenta. Ekstrak etanol brokoli dapat menurunkan kadar MDA plasenta tikus bunting yang terpapar asap rokok dan dosis efektif dalam penelitian ini adalah 400 mg/kgBB.

Kata Kunci: *Malondialdehyde*, brokoli, asap rokok, kehamilan

ABSTRACT

Rohmawati, Yuliani. 2019. **Effectiveness of Giving Broccoli Ethanol Extract (*Brassica oleracea*) on Decreasing Placental Malondialdehyde (MDA) Levels *Rattus norvegicus* Exposed to Cigarette Smoke**. Final Assignment, Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Elly Mayangsari, M. Biomed, (2) Nur Aini Retno H, SST, M. Keb.

In cigarette smoke there are many free radicals that are harmful to pregnant women. Exposure to cigarette smoke during pregnancy results in oxidative stress and placental lipid peroxidation with the end result of *Malondialdehyde* (MDA). The occurrence of placental lipid peroxidation can cause placental endothelial cell damage. Broccoli contains antioxidant compounds that can capture free radicals so prevent oxidative stress. This study was conducted to determine effect of broccoli ethanol extract on MDA levels in placental pregnant mice exposed to cigarette smoke. The research design used was Randomized Post Test Only Control Group Design using pregnant mice. The sample was divided into 2 control groups (K (-) = no treatment, K (+) = exposed to cigarette smoke) and 3 treatment groups with exposure to cigarette smoke and broccoli ethanol extract with different doses (P1 = 100, P2 = 200, P3 = 400 mg / kgBW / day). The administration of broccoli ethanol extract starts from 1-19 days, while exposure to cigarette smoke begins on the 7-19 day of pregnancy. The One Way ANOVA test results found differences between groups ($p = 0,000$). In the Tukey HSD analysis, the results of the K (+) comparison with P1, P2, and P3 obtained $p = 0,000$ which means there are significant differences. The Pearson correlation test shows direction of the negative relationship which means the greater broccoli ethanol extract given, the lower placental MDA level. Broccoli ethanol extract can reduce MDA level of placenta in pregnant mice exposed to cigarette smoke and effective dose in this study is 400 mg / kgBW.

Keywords: *Malondialdehyde*, broccoli, cigarette smoke, pregnancy

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Halaman Persetujuan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Gambar	xiii
Daftar Lampiran.....	xiv
Daftar Singkatan.....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Rokok dan Asap Rokok	6

2.1.1	Pengertian.....	6
2.1.2	Jenis-Jenis Asap Rokok	8
2.1.3	Kandungan dan Fase Rokok	9
2.1.4	Dampak Paparan Asap Rokok pada Kehamilan	11
2.1.5	Farmakokinetik Asap Rokok	12
2.2	Rokok sebagai Radikal Bebas	13
2.2.1	Radikal Bebas, ROS, dan Stres Oksidatif.....	13
2.2.2	Peroksidasi Lipid dan MDA.....	16
2.3	Antioksidan	18
2.4	Brokoli.....	21
2.4.1	Klasifikasi Brokoli	21
2.4.2	Kandungan Gizi dan Zat Aktif Brokoli	22
2.4.3	Brokoli sebagai Antioksidan.....	23
2.4.4	Flavonoid.....	24
2.5	Rattus norvegicus	25
2.5.1	Klasifikasi	28
2.5.2	Siklus Reproduksi.....	28
2.6	Plasenta.....	30
2.6.1	Fungsi Plasenta.....	31
2.6.2	Sirkulasi Plasenta.....	32
2.6.3	Struktur Histologi Plasenta	33
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	34
3.2	Hipotesis Penelitian	36

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	37
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	37
4.2.1 Pemilihan Sampel	37
4.2.2 Jumlah Sampel.....	38
4.3 Variabel Penelitian	39
4.3.1 Variabel Bebas	39
4.3.2 Variabel Terikat	39
4.4 Tempat dan Waktu penelitian	39
4.5 Bahan dan Alat Penelitian.....	39
4.5.1 Bahan Penelitian	39
4.5.2 Alat Penelitian	40
4.6 Definisi Operasional.....	42
4.7 Prosedur Penelitian.....	42
4.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba.....	42
4.7.2 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba	42
4.7.3 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba	43
4.7.4 Pembagian Kelompok Hewan Coba	43
4.7.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Brokoli	44
4.7.6 Penentuan Dosis Ekstrak Etanol Brokoli	45
4.7.7 Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli	47
4.7.8 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba	47
4.7.9 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Plasenta	48
4.7.10 Prosedur Pengukuran Kadar MDA Plasenta.....	49
4.8 Alur Penelitian.....	50
4.9 Analisis Data.....	51

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian	53
5.2 Analisis Data.....	55

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli Pada Tikus.....	58
6.2 Keterbatasan Penelitian.....	64

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan.....	65
7.2 Saran.....	65

Daftar Pustaka	67
-----------------------------	-----------

Lampiran	77
-----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Jenis-Jenis <i>Reactive Oxygen Species</i>	15
Tabel 2.2 Macam-Macam Enzim Antioksidan	20
Tabel 2.3 Kandungan Zat Gizi Brokoli.....	22
Tabel 2.4 Hasil Pengamatan Kadar Flavonoid Total dan IC ₅₀	23
Tabel 2.5 Data Fisiologis dan Reproduksi <i>Rattus norvegicus</i>	27
Tabel 5.1 Uji Normalitas.....	55
Tabel 5.2 Uji Homogenitas Varian	55
Tabel 5.3 Hasil Uji One Way ANOVA Rerata Kadar MDA Plasenta	56
Tabel 5.4 Hasil Uji Tukey-HSD Rerata Kadar MDA Plasenta Tikus.....	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Proses Terbentuknya ROS	15
Gambar 2.2 Konsep Umum Stres Oksidatif	16
Gambar 2.3 Proses Terjadinya Peroksidasi Lipid.....	17
Gambar 2.4 Brokoli (<i>Brassica oleracea</i>)	21
Gambar 2.5 Struktur Kerangka Dasar Flavonoid dan Kelasnya	24
Gambar 2.6 <i>Rattus norvegicus</i>	26
Gambar 2.7 Identifikasi Fase Siklus Estrus.....	29
Gambar 2.8 Penampilan Vagina pada Setiap Fase Siklus Estrus	30
Gambar 2.9 Plasenta.....	31
Gambar 2.10 Struktur Histologi Plasenta	33
Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian.....	50
Gambar 5.1 Histogram Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Surat Kelaikan Etik.....	77
Lampiran 2 Kadar MDA Plasenta Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	78
Lampiran 3 Hasil Uji Normalitas, Homogenitas Varian, dan ANOVA.....	79
Lampiran 4 Hasil Uji Tukey HSD dan Uji Korelasi <i>Pearson</i>	80
Lampiran 5 Pembuatan dan Pengenceran Ekstrak Etanol Brokoli	82
Lampiran 6 Pemeliharaan dan Pengawinan Hewan Coba	84
Lampiran 7 Pemberian Ekstrak dan Pemaparan Asap Rokok.....	85
Lampiran 8 Pembedahan Hewan Coba	86
Lampiran 9 Pengukuran Kadar MDA Plasenta.....	87

DAFTAR SINGKATAN

CAT	: <i>Catalase</i>
CO	: Karbon monoksida
Cu	: Tembaga
Fe ²⁺	: Ion feros
GATS	: <i>Global Adult Tobacco Survey</i>
GPx	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
GSH	: <i>Glutathion Sulfur Hidroksil</i>
GR	: <i>Glutathione reduktase</i>
HCL	: <i>Hypochlorite Acid</i>
HCN	: Hidrogen sianida
H ₂ O	: Air
H ₂ O ₂	: Hidrogen peroksida
H ₂ S	: Hydrogen sulfide
IC ₅₀	: <i>Inhibitor concentration of 50%</i>
LOO [•]	: Radikal lipid peroksil
LOOH	: <i>Lipid hydroperoxide</i>
MDA	: <i>Melonaldehyde</i>
Mn	: Mangan
NH ₃	: Amonia
NO [•]	: Nitrit oksida
NO ₂ [•]	: Nitrit dioksida
O ₂ ^{•-}	: Radikal anion superoksid
¹ O ₂	: <i>Singlet oxygen</i>

OH [•]	: Radikal hidroksil
ONOO [•]	: Radikal peroksinitrit
PBS	: <i>Phospate buffer saline</i>
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
RO [•]	: Radikal alkoksil
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismustase</i>
TCA	: <i>Tri Chloride Acetil Acid</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
Zn	: Seng

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Merokok merupakan kebiasaan yang sering dijumpai di kalangan masyarakat. Menurut *The Tobacco Atlas 3rd edition 2009*, Indonesia merupakan negara dengan persentase perokok tertinggi di Asia Tenggara (46,16%) (Kemenkes RI, 2015). Selain itu Indonesia menduduki peringkat ketiga sebagai perokok terbesar di dunia setelah Cina dan India (Kemenkes RI, 2017). Menurut Riskesdas (2013) sekitar 85% rumah tangga terpapar rokok (Kemenkes RI, 2014), dari jumlah tersebut tidak menutup kemungkinan terdapat ibu hamil diantaranya yang menjadi perokok pasif. Di Indonesia lebih dari 50% wanita hamil menjadi perokok pasif rumah tangga (Reece *et al.*, 2018).

Analisis WHO menunjukkan bahwa efek buruk asap rokok lebih besar pada perokok pasif dibandingkan perokok aktif. Hal ini dikarenakan perokok pasif terpapar *sidestream smoke* (asap dari bagian ujung rokok yang terbakar) dimana *sidestream smoke* ini terbukti mengandung hasil pembakaran tembakau lebih banyak daripada *mainstream smoke* (asap yang dihisap oleh perokok) (Umami, 2010). Paparan asap rokok selama kehamilan dapat meningkatkan resiko kehamilan ektopik, ketuban pecah dini, abruptio plasenta, plasenta previa, keguguran, kelahiran mati, kelahiran prematur, berat lahirrendah, kecil usia kehamilan, anomali kongenital seperti bibir sumbing (WHO, 2013).

Asap rokok mengandung lebih dari 2500 bahan kimia dan beberapa diantaranya berbahaya bagi perkembangan janin serta dapat menimbulkan

dampak merugikan pada kehamilan (Bruchova *et al.*, 2010). Asap rokok dalam fase tar mengandung $>10^{17}$ radikal bebas/g, sedangkan fase gas mengandung $>10^{15}$ radikal bebas/hisapan rokok (Ambrose *et al.*, 2004). Selama kehamilan kebutuhan metabolik dan oksigen meningkat, hal ini menyebabkan produksi ROS (*Reactive oxygen species*) berlebih. Paparan asap rokok selama kehamilan akan semakin meningkatkan jumlah ROS (*Reactive oxygen species*) dalam tubuh sehingga resiko stres oksidatif akan meningkat (Chelchowska *et al.*, 2011). Stres oksidatif terjadi ketika terdapat ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan endogen, yang disebabkan oleh tingginya radikal bebas dalam tubuh sehingga kapasitas antioksidan endogen tidak mampu menetralkan (Banjarnahor dan Artanti, 2014). Reaksi oksidasi antara ROS (*Reactive oxygen species*) dengan PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) disebut peroksidasi lipid dan akan menghasilkan senyawa *Melondialdehyde* (MDA) yang bersifat toksik terhadap sel (Grotto *et al.*, 2009). Peroksidasi lipid dan MDA akan mengakibatkan kerusakan membran sel, termasuk disini membran sel endotel plasenta (Eberhardt, 2001 dalam Adnyana, 2013).

Plasenta memegang peranan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan janin dengan transpor nutrisi dan oksigen dari ibu ke janin (GacciolidanLager, 2016). Kerusakan pada sel endotel plasenta dapat menyebabkan insufisiensi plasenta yaitu terhambatnya transport nutrisi dan oksigen pada janin sehingga pertumbuhan dan perkembangan janin akan terganggu. *Melondialdehyd* (MDA) sering digunakan sebagai indikator dalam mengukur tingkat stres oksidatif. Tingginya kadar MDA menunjukkan adanya proses oksidasi lipid membran sel, sedangkan kadar MDA yang rendah menunjukkan status antioksidan yang baik (Winarsi *et al.*, 2013).

Tubuh secara alami memiliki antioksidan endogen seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathione Peroxidase* (GPx), *Glutathione* (GSH), dan *Catalase* (CAT) yang mampu mengatasi efek radikal bebas (Lobo *et al.*, 2010). Tingginya radikal bebas dalam tubuh akibat paparan asap rokok menimbulkan kondisi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dan kapasitas antioksidan endogen. Pada kondisi ini tambahan asupan antioksidan eksogen sangat diperlukan (Kahnamoei *et al.*, 2014). Salah satu antioksidan eksogen yang memiliki aktivitas antioksidan cukup tinggi adalah brokoli. Penelitian yang dilakukan oleh Lutfita (2012) membuktikan ekstrak etanol brokoli dengan metode maserasi memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} (*inhibitory concentration of 50%*) = 3,63 $\mu\text{g/ml}$, dimana antioksidan ini termasuk antioksidan sangat kuat ($IC_{50} < 50$) (Lutfita, 2012).

Brokoli dikenal sebagai “*Crown Jewel of Nutrition*” karena mengandung banyak nutrisi seperti serat, vitamin, mineral, dan metabolit sekunder yang sangat bermanfaat bagi kesehatan (Vasanthi *et al.*, 2009). Kandungan vitamin dan mineral pada brokoli meliputi vitamin A, thiamin, riboflavin, tembaga, besi, magnesium, fosfor, kalium, seng, dll. Selain itu brokoli juga mengandung berbagai antioksidan seperti karotenoid, tokoferol, asam askorbat, dan flavonoid (Kramarova *et al.*, 2009). Flavonoid dapat mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksil kepada senyawa radikal bebas sehingga menjadi senyawa yang stabil. Selain itu gugus keton hidroksil pada flavonoid dapat mengkelat logam yang menjadi katalis pada peroksidasi lipid (Rezaeizadeh *et al.*, 2011).

Sejauh ini belum ada penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea*) terhadap kadar MDA plasenta tikus bunting yang terpapar asap rokok. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti

bahwa brokoli dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan eksogen yang dapat menurunkan kadar MDA plasenta tikus bunting yang terpapar asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea*) terhadap kadar MDA plasenta *Rattus norvegicus* bunting yang terpapar asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea*) terhadap kadar MDA plasenta *Rattus norvegicus* bunting yang terpapar asap rokok.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh paparan asap rokok terhadap kadar MDA plasenta *Rattus norvegicus* bunting
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea*) terhadap kadar MDA plasenta *Rattus norvegicus* bunting yang terpapar asap rokok.
3. Mengetahui dosis efektif ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea*) yang dapat menurunkan kadar MDA plasenta *Rattus norvegicus* bunting yang terpapar asap rokok.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Menambah pengetahuan dan pemahaman mengenai pengaruh ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea*) terhadap kadar MDA plasenta *Rattus norvegicus* bunting yang terpapar asap rokok serta dapat digunakan sebagai studi pustaka untuk penelitian selanjutnya.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi mengenai potensi pengembangan brokoli sebagai fitofarmako untuk mencegah terjadinya stres oksidatif akibat paparan asap rokok selama kehamilan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rokok dan Asap Rokok

2.1.1 Pengertian

Rokok adalah hasil olahan tembakau yang berasal dari tanaman *nicotiana tabacum*, *nicotiana rustica*, dan spesies lainnya atau sintesisnya yang dibakar kemudian dihisap atau dihirup asapnya yang mengandung tar dan nikotin, bisa dengan atau tanpa bahan tambahan, termasuk rokok kretek, rokok putih, cerutu atau bentuk lainnya (Peraturan Pemerintah Republik Indonesia, 2012). Rokok adalah lintingan atau gulungan tembakau yang dibungkus dengan kertas, daun atau kulit jagung, sebesar kelingking dan panjangnya sekitar 8-10 cm yang dibakar ujungnya kemudian dihisap asapnya. Satu batang rokok yang dibakar dan dihisap dapat menghasilkan lebih dari 4000 bahan kimia dimana 400 diantaranya beracun dan 40 diantaranya dapat menyebabkan kanker (Dinas Kesehatan Provinsi Banten, 2017).

Di Indonesia rokok dapat dibagi menjadi beberapa jenis yaitu sebagai berikut (Jaya, 2009):

a. Berdasarkan bahan pembungkus rokok:

- Klobot: rokok yang bahan pembungkusnya berupa daun jagung
- Kawung: rokok yang bahan pembungkusnya berupa daun aren
- Sigaret: rokok yang bahan pembungkusnya berupa kertas.
- Cerutu: rokok yang bahan pembungkusnya berupa daun tembakau.

b. Berdasarkan bahan baku/isi rokok:

-Rokok Putih: rokok yang bahan bakunya berupa daun tembakau yang diberi saus untuk mendapatkan efek rasa dan aroma tertentu.

-Rokok Kretek: rokok yang bahan bakunya berupa daun tembakau dan cengkeh yang diberi saus untuk mendapatkan efek rasa dan aroma tertentu.

-Rokok Klembak: rokok yang bahan bakunya berupa daun tembakau, cengkeh, dan kemenyan yang diberi saus untuk mendapatkan rasa dan aroma tertentu.

c. Berdasarkan proses pembuatan rokok

-Sigaret kretek tangan (SKT): rokok yang proses pembuatannya dengan cara digiling atau dilinting menggunakan tangan dan atau alat bantu sederhana.

-Sigaret kretek mesin (SKM): rokok yang proses pembuatannya menggunakan mesin.

d. Berdasarkan penggunaan filter pada rokok:

-Rokok Filter (RF): rokok yang bagian pangkalnya terdapat gabus.

-Rokok Non Filter: rokok yang bagian pangkalnya tidak terdapat gabus.

Asap rokok sebagai hasil pembakaran rokok berisi campuran kompleks zat toksik dan mayoritas adalah radikal bebas yang mampu menurunkan senyawa GSH (*Gluthathion Sulfur Hidroksil*) sebagai antioksidan enzimatik di dalam tubuh (Hallwell & Gutteridge, 2007). Asap rokok merupakan campuran kompleks komponen kimia yang banyak mengandung bahan kimia beracun, penyebab kanker, penyebab mutagenik, serta menghasilkan radikal bebas, pro oksidan dan ROS yang pada fase gas dan tar dapat menimbulkan stres oksidatif dan berpotensi merusak lipid, membran sel, protein, enzim, dan DNA. Komponen

rokok yang berukuran 0,1-1,0 μm secara inhalasi dapat melalui filter dan akan diserap alveoli di paru-paru kemudian akan masuk ke peredaran darah dan dibawa ke seluruh tubuh (Valavanidis *et al.*, 2009).

2.1.2 Jenis-Jenis Asap Rokok

Asap rokok dapat dibedakan menjadi dua jenis yaitu:

1. *Mainstream Smoke* (asap rokok utama)

Merupakan asap rokok dari perokok aktif yaitu asap yang dibakar dan dihisap oleh perokok kemudian dihembuskan ke udara (WHO, 2016).

2. *Sidestream Smoke* (asap rokok sampingan)

Merupakan asap yang berasal dari sebatang rokok yang membara pada perangkat rokok (cerutu, pipa, bidi, dll) atau tanpa menggunakan perangkat rokok (WHO, 2016).

Ketika perokok membakar sebatang rokok dan menghisapnya, asap yang dihisap oleh perokok disebut asap utama (*mainstream*) sedangkan asap yang keluar dari ujung rokok yang terbakar disebut asap sampingan (*sidestream*). Perokok aktif akan terpapar *mainstream smoke* (asap yang dihisap oleh perokok itu sendiri) yang mengandung 8% fase tar dan 92% fase gas. Perokok pasif akan terpapar 85% *sidestream smoke* (asap dari ujung rokok yang terbakar) dan 15% *mainstream smoke* (asap yang dihembuskan oleh perokok aktif) (Ambrose *et al.*, 2004). Asap sampingan (*sidestream smoke*) terbukti mengandung hasil pembakaran tembakau lebih banyak dibandingkan asap utama (*mainstream smoke*). *Sidestream smoke* mengandung 5 kali lipat karbonmonoksida, 3 kali lipat tar dan nikotin, 46 kali lipat amonia, 3 kali lipat nikel, dan 50 kali lipat nitrosamin dibandingkan *mainstream smoke*. Demikian juga zat-zat racun lainnya lebih tinggi kadarnya pada asap rokok sampingan (Umami, 2010). Hal ini

dikarenakan *sidestream smoke* menghasilkan asap rokok terus menerus selama rokok menyala meskipun tidak dihisap tanpa melalui penyaringan atau filter. Menurut Riskesdes (2013), paparan asap rokok di dalam rumah tangga mencapai 85% (Kemenkes RI, 2014). Di Indonesia lebih dari 50% wanita hamil menjadi perokok pasif rumah tangga. Prevalensi wanita hamil yang menjadi perokok pasif 10 kali lebih besar dibandingkan perokok aktif (Reece *et al.*, 2018).

2.1.3 Kandungan dan Fase Rokok

Rokok mengandung berbagai zat kimia yang berbahaya bagi kesehatan. Kandungan pada rokok dapat dilihat pada gambar 2.1. Tar, nikotin dan karbon monoksida merupakan racun utama dalam rokok (Jaya, 2009). Setiap batang rokok kretek mengandung 34-65 mg tar, 1,9-2,6 mg nikotin, dan 18-28 mg CO (Haris, 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Yuningtyaswari (2001) melaporkan bahwa tingkat peroksidasi lipid akibat rokok kretek lebih besar dibandingkan rokok putih.



Gambar 2.1 Bahan-Bahan yang Terkandung dalam Rokok (Haris *et al.*, 2012)

Asap rokok mengandung lebih dari 4000 jenis bahan kimia, 250 diantaranya diketahui berbahaya dan lebih dari 50 bahan kimia dapat menyebabkan kanker (WHO, 2018). Zat-zat dari asap rokok terkandung dalam

fase gas dan fase partikulat (tar) yang semuanya memiliki efek berbahaya bagi sel (Valavanidis *et al.*, 2009). Fase asap rokok dibagi menjadi dua bentuk yaitu:

1. Fase Gas

Fase gas adalah berbagai macam gas berbahaya yang dihasilkan oleh asap rokok yang terdiri dari nitrogen, amonia (NH_3), karbon monoksida (CO), CO_2 , NO^\cdot , NO_2^\cdot , H_2S , metana, hidrogen sianida (HCN), aldehid yang mudah menguap, benzene, toluena, aseton, vinil klorida, *unsaturated hydrocarbon*, metilamin, nitropan. Bahan kimia yang paling banyak terkandung pada fase gas adalah karbon monoksida (CO). Karbon monoksida merupakan gas racun yang tidak berwarna dan tidak berbau, dapat menyebabkan berkurangnya transport dan pemanfaatan oksigen ke jaringan tubuh. Asap rokok dalam fase gas ini mengandung $>10^{15}$ radikal bebas per hisapan (Valavanidis *et al.*, 2009; Fowles dan Bates, 2000; Halliwell dan Gutteridge, 2007).

NO^\cdot merupakan radikal bebas yang dihasilkan oleh asap rokok dan dihasilkan juga oleh tubuh sebagai respon inflamasi karena paparan asap rokok. Kadar NO yang meningkat ini akan diubah menjadi radikal peroksinitrit (ONOO^\cdot) melalui reaksi dengan radikal superoksida (O_2^\cdot) sehingga menimbulkan stres oksidatif pada jaringan (Halliwell dan Gutteridge, 2007).

2. Fase Partikulat/Tar

Fase tar adalah bahan yang terserap dari penyaringan asap rokok menggunakan filter *cartridge* dengan ukuran pori-pori $0,1 \mu\text{m}$ (Haris *et al.*, 2012). Rokok mengandung sejumlah tar dimana satu gram tar mengandung $>10^{17}$ radikal bebas. Komponen yang termasuk dalam fase partikulat/tar adalah tar, nikotin, logam (kadmium, aluminium, besi, nikel, mangan, kromium, arsenik), phenol/ *semiquinone*/ *quinone*, hidrokarbon karsinogen (*benzpyrene*,

benzanthracene, chrysene), dan karsinogen lainnya seperti nitrosamin (Halliwell dan Gutteridge, 2007).

2.1.4 Dampak Paparan Asap Rokok pada Kehamilan

Kehamilan merupakan kondisi fisiologis yang disertai dengan tingginya kebutuhan metabolis dan peningkatan kebutuhan oksigen, hal ini menyebabkan produksi ROS berlebih. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kadar MDA akan meningkat di akhir trimester jika dibandingkan dengan kadar MDA wanita yang tidak hamil. Paparan asap rokok selama kehamilan akan meningkatkan resiko kerusakan oksidatif yang tidak hanya disebabkan oleh peningkatan kadar oksigen bebas secara fisiologis akibat kehamilan tetapi juga karena radikal dalam asap rokok (Chelchowska *et al.*, 2011).

Efek merugikan terkait dengan paparan rokok selama kehamilan dapat terjadi melalui beberapa mekanisme yang berbeda, baik secara tidak langsung dengan mempengaruhi jaringan plasenta dan aliran darah arteri umbilikal maupun secara langsung melalui transfer plasenta (Shea and Steiner, 2008). Asap rokok memicu terjadinya stres oksidatif sehingga mengakibatkan aktivitas peroksidasi lipid meningkat yang ditandai dengan tingginya kadar MDA dan rendahnya kadar SOD (Jain, 2009). Ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Chelchowska *et al* (2011) yang menyatakan bahwa asap rokok dapat menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid dan penurunan kapasitas antioksidan pada plasma wanita hamil dan darah tali pusat (Chelchowska *et al.*, 2011). Paparan asap rokok selama kehamilan dapat meningkatkan resiko kehamilan ektopik, ketuban pecah dini, abruptio plasenta, plasenta previa, keguguran, kelahiran mati, kelahiran prematur, berat lahir rendah, kecil usia kehamilan, anomali kongenital seperti bibir sumbing (WHO, 2013).

2.1.5 Farmakokinetik Asap Rokok

Radikal bebas dapat berasal dari sisa hasil metabolisme tubuh dan dari luar tubuh seperti sinar UV, asap rokok, dll. Asap rokok mengandung berbagai zat kimia beracun dan zat-zat pro oksidan yang dapat menghasilkan ROS. Fase gas pada asap rokok berisi racun dan radikal bebas. Tar yang larut air dapat membentuk ROS seperti SO (*superoxideanion*), H_2O_2 dan radikal hidroksil. Keberadaan ROS yang berlebih dalam tubuh dapat merusak struktur dasar sel dan DNA. Bahan-bahan kimia yang terkandung dalam asap rokok dapat masuk ke paru-paru kemudian masuk ke dalam aliran darah. Aliran darah maternal terhubung dengan plasenta. Berbagai bahan kimia dari asap rokok seperti nikotin, karbon monoksida, dan cadmium dapat melewati plasenta dan masuk ke jaringan janin, dimana hal ini terbukti pada studi manusia dan hewan coba. Sebagian besar racun tembakau memiliki berat molekul yang rendah dan kelarutan air yang tinggi sehingga dengan mudah dapat melewati plasenta. Khususnya nikotin dan metabolit utamanya yaitu cotinine dapat dengan cepat melewati jaringan plasenta dan masuk ke aliran darah janin. Pengukuran nikotin dan cotinine pada cairan amnion dan plasma janin menunjukkan konsentrasi lebih tinggi dibandingkan konsentrasi pada ibu. Konsentrasi nikotin pada janin 15% lebih tinggi daripada konsentrasi pada ibu. Nikotin dapat mengurangi aliran darah uterus dan meningkatkan resistensi uterus. Penurunan aliran darah dan peningkatan resistensi vaskular menghalangi transport nutrisi dan oksigen ke janin, menciptakan keadaan hipoksia dan malnutrisi sehingga mempengaruhi perkembangan janin (Fitria *et al.*, 2013; Mattsson, 2015; Knopik *et al.*, 2012).

Karbon monoksida bukan termasuk jenis radikal bebas namun senyawa ini dapat menginisiasi proses biologis tubuh untuk menghasilkan radikal bebas.

Semua senyawa yang mengandung oksigen dapat memicu pembentukan radikal bebas. Hal ini dikarenakan O₂ bersifat diradikal dan merupakan pereaksi (agen) dari radikal bebas. Oksigen yang berasal dari senyawa karbon monoksida juga dapat memicu pembentukan radikal bebas. Misalnya saat oksigen bertemu dengan L-arginin dapat membentuk radikal bebas seperti nitrit oksida (NO) dan nitrit peroksida (NO₂). Konsentrasi kadmium yang sama di talipusat dan serum ibu mengindikasikan bahwa kadmium ditransfer dengan mudah ke janin lewat plasenta. Kadmium dapat memberikan efek negatif pada berat lahir janin dengan cara mengganggu metabolisme dan asupan nutrisi (Lovita *et al.*, 2014; Jauniaux *et al.*, 2007).

2.2 Rokok sebagai Radikal Bebas

2.2.1 Radikal Bebas, *Reactive Oxygen Reactive* (ROS), dan Stres Oksidatif

Radikal bebas adalah molekul, atom, atau beberapa atom yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit luarnya sehingga bersifat sangat reaktif. Suatu molekul bersifat stabil bila elektronnya berpasangan, akan tetapi bila tidak berpasangan maka molekul tersebut menjadi tidak stabil dan berpotensi untuk merusak. Bila molekul tidak stabil ini mengambil satu elektron dari senyawa lain, maka molekul tersebut menjadi stabil sedangkan molekul yang diambil elektronnya tadi menjadi tidak stabil. Molekul tersebut akan berubah menjadi radikal dan memicu reaksi pembentukan radikal bebas berikutnya, reaksi berantai (Rumbold *et al.*, 2012). Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein, unsur *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), dan juga karbohidrat. Namun diantara molekul-molekul tersebut yang paling rentan menjadi target radikal bebas adalah asam lemak tak jenuh.

Tingginya radikal bebas dalam tubuh dapat ditunjukkan oleh rendahnya aktivitas enzim antioksidan (SOD) dan tingginya kadar Malondialdehid (MDA) dalam plasma (Winarsi, 2011). Radikal bebas memiliki reaktifitas yang sangat tinggi hal ini ditunjukkan dengan sifatnya yang menarik atau menyerang elektron di sekitarnya. Jika radikal bebas tidak diinaktivasi, reaktivitasnya dapat merusak seluruh tipe makromolekul seluler, termasuk karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat (Maslachah, 2009).

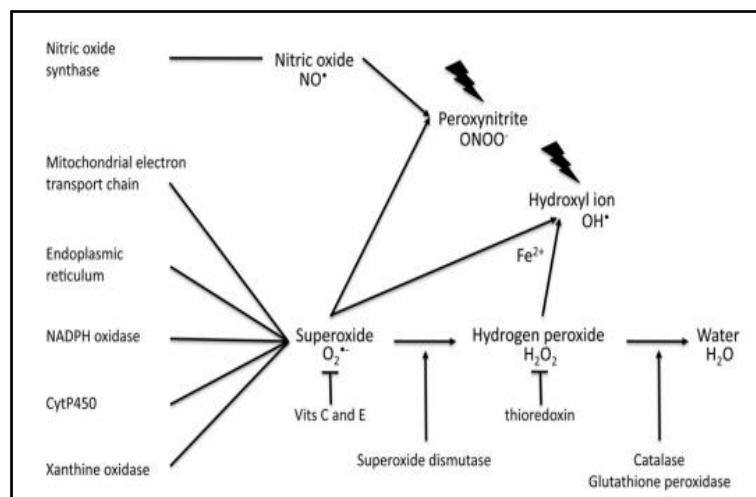
Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (endogen) dan juga dari luar tubuh (eksogen) (Muchtadi, 2013). Radikal bebas endogen terbentuk sebagai respon normal dari rantai respirasi atau pernafasan pada waktu oksigen secara bertahap direduksi menjadi air (reduksi oksigen), pada proses auto oksidasi, oksidasi enzimatis, fagositosis dalam respirasi, transport elektron di mitokondria. Sedangkan radikal bebas eksogen berasal dari luar sistem tubuh, misalnya radiasi, sinar UV, aktivitas lingkungan, zat-zat polusi, ozon, pestisida dan asap rokok (Agarwal *et al.*, 2012).

ROS dapat dibagi menjadi dua kelas yaitu *oxygen-centered radicals* dan *oxygen-centered non-radicals*. Yang termasuk *oxygen-centered radicals* meliputi anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^\cdot), radikal alkoksil (RO^\cdot), dan radikal peroksil (RO_2^- atau ROO^\cdot). Sedangkan yang termasuk *oxygen-centered non-radicals* adalah hidrogen peroksida (H_2O_2) dan singlet oxygen (1O_2). Radikal yang paling berbahaya adalah radikal hidroksil karena mampu merusak asam lemak membran sel, DNA dan protein. Spesies reaktif lain adalah nitrit oksida (NO), nitrit dioksida (NO_2^-), dan peroksinitrit ($ONOO^-$). Anion superoksida merupakan *precursor* sebagian besar senyawa ROS serta merupakan mediator dalam rantai

reaksi oksidatif (Bouayed dan Bohn, 2010; Muchtadi, 2013; Halliwell and Gutteridge, 2007).

Tabel 2.1 Jenis-Jenis *Reactive Oxygen Species* (El-Bahr, 2013)

ROS		Keterangan
Anion superoksida	O_2^-	Tidak terlalu merusak tapi dapat membentuk hydrogen peroksida, yang merupakan reduktan logam transisi dalam pembentukan radikal hidroksil
Radikal hidroksil	OH^\cdot	Radikal pengoksidasi yang sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan hampir seluruh biomolekul
Radikal peroksil	LO_2	Dihasilkan antara lain pada proses peroksidasi lipid
Hydrogen peroksida	H_2O_2	Hydrogen peroksida bukan merupakan sumber radikal hidroksil dalam kondisi jenuh ion logam transisi, terlibat juga dalam pembentukan HOCl
Oksigen singlet	1O_2	Meskipun bukan radikal bebas, tetapi merupakan pengoksidasi yang kuat
Nitrit oksida	NO^\cdot	Radikal bebas dalam bentuk gas
Peroksinitrit	$ONOO^-$	Terbentuk dari reaksi NO dengan O_2^-
Asam hipoklor	$HOCl$	Dihasilkan oleh netrofil pada poses inflamasi terbentuk dari H_2O_2 dan Cl^- yang dikatalis oleh mieloperoksidase

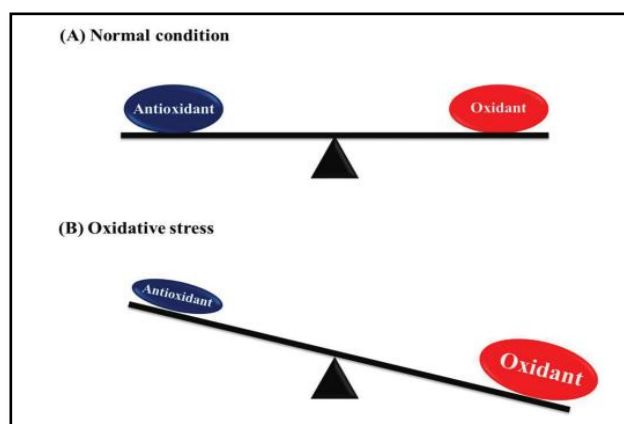


Gambar 2.2 Proses Terbentuknya ROS

Sumber superoksida lain pada kondisi fisiologis termasuk enzim NADPH oxidase, yang menghasilkan superoksida dalam jumlah besar selama kehamilan terutama pada kehamilan awal, cytochrome P450, dan oksida reduktase. Superoksida (O_2^-) didetoksifikasi oleh enzim super oksida dismutase (SOD), yang mengubahnya menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2). H_2O_2 bukan radikal bebas dan lebih tidak reaktif daripada O_2^- . Enzim katalase dan GPX mendetoksifikasi hydrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O). Ketidakseimbangan konsentrasi O_2^- maupun hydrogen peroksida dengan kapasitas enzim antioksidan dapat menyebabkan pembentukan ion hidroksil (OH^\cdot) yang jauh lebih berbahaya. Reaksi ini dikatalisis oleh ion besi (Fe) bebas dalam reaksi feton. Selain itu pembentukan superoksida (O_2^-) berlebih juga dapat menyebabkan interaksi dengan nitrit oksida (NO) yang akan membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$) yang lebih berbahaya. Semua reaksi tersebut akan dihambat oleh vitamin C dan E sehingga radikal bebas tidak terbentuk (Burton dan Jauniaux, 2011).

Ketidakseimbangan antara produksi ROS dan sistem antioksidan dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Gubory *et al.*, 2010). Stres oksidatif dapat terjadi karena konsumsi pangan yang kurang (defisiensi) antioksidan,

akibat meningkatnya produksi radikal bebas dan ROS yang disebabkan oleh toksin dari makanan atau lingkungan dan tidak cukupnya aktivasi fagosit misalnya pada kondisi inflamasi kronis (Muchtadi, 2013). Terjadinya stres oksidatif pada sistem biologis sering ditandai dengan peningkatan formasi radikal bebas dan oksidan lainnya, penurunan antioksidan, ketidakseimbangan reaksi redoks pada sel, kerusakan oksidatif pada komponen-komponen sel seperti lemak, protein dan DNA (Powers dan Jackson, 2008).



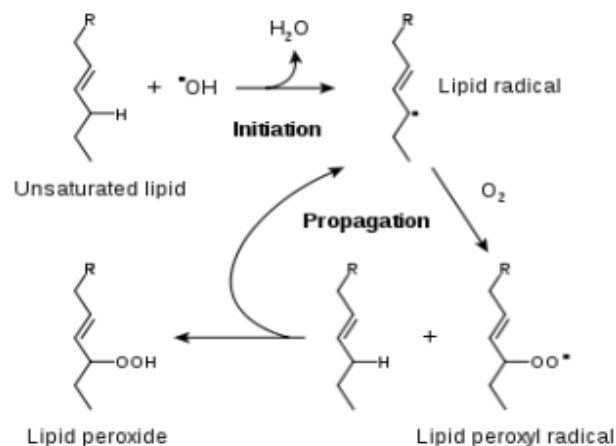
Gambar 2.3 Konsep Umum Stres Oksidatif

(a) Pada kondisi normal terjadi keseimbangan antara produksi oksidan dan sistem pertahanan antioksidan (b) Stres oksidatif terjadi ketika terdapat ketidakseimbangan antara generasi oksidan dan antioksidan (Polipoch dan Koomhin, 2015)

2.2.2 Peroksidasi Lipid dan MDA (Melondialdehid)

Mekanisme kerusakan sel atau jaringan akibat serangan radikal bebas yang paling awal diketahui dan terbanyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks yang terjadi ketika ROS berinteraksi dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) pada membran sel dan membentuk hidroperoksida (Burton dan Jauniaux, 2011). Proses peroksidasi lipid terdiri dari 3 fase yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Inisiasi adalah fase yang diawali dengan reaksi oksigen yang aktif seperti singlet oksigen atau OH^\cdot dengan senyawa lemak atau dari pemecahan hidroperoksid lemak oleh *transition metals* membentuk radikal lipid karbon yang sangat reaktif (L^\cdot). Pada fase

propagasi, molekul oksigen dan L^\cdot akan membentuk radikal lipid peroksil (LOO^\cdot) yang dapat memindahkan atom hidrogen dari berbagai sumber seperti DNA dan protein hingga membentuk hasil utama oksidasi yaitu *lipid hydroperoxide* ($LOOH$). Radikal lipid peroksil juga dapat menarik atom hidrogen dari molekul lemak lainnya (LH) menghasilkan L^\cdot yang mempropagasi rantai radikal. Pada fase terminasi terjadi melaluipenggabungan dua senyawa radikal membentuk produk non radikal yang bersifat stabil dan tidak dapat mempropagasi peroksidasi lemak (Halliwell dan Gutteridge, 2007).



Gambar 2.4 Proses Terjadinya Peroksidasi Lipid (Crimp, 2006)

Keterangan : Proses terjadinya peroksidasi lipid terdiri dari 3 tahap yaitu inisiasi, propagansi dan terminasi

Reaksi peroksidasi lipid ini pada akhirnya adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel. Senyawa tersebut antara lain berbagai aldehyd seperti melondialdehida (MDA), 9-hidroksi nonenal, etana (C_2H_6), dan pentane (C_5H_{12}) (Valko *et al.*, 2007; Suryohudoyo, 2007; Grotto *et al.*, 2009).

Melondialdehyde (MDA) merupakan produk peroksidasi lipid yang merupakan aldehyd reaktif dan merupakan salah satu dari banyak spesies elektrofil yang menyebabkan stres toksik pada sel (Eberhardt, 2001). MDA

dianggap sebagai marker yang paling banyak diteliti, dan dianggap sebagai marker lipid peroksidasi *in vivo* yang baik pada manusia maupun hewan coba yang secara signifikan akurat dan stabil daripada senyawa lain. MDA telah digunakan secara luas sebagai marker klinis peroksidasi lipid (Niki, 2009).MDA sangat tepat digunakan sebagai biomarker untuk stres oksidatif karena pembentukan MDA meningkat sesuai dengan stres oksidatif, kadarnya dapat diukur secara akurat dengan berbagai metode yang tersedia, bersifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, pengukurannya tidak dipengaruhi kandungan lemak dalam diet, merupakan produk spesifik dari peroksidasi lipid, dan terdapat dalam jumlah yang dapat dideteksi pada semua jaringan tubuh dan cairan biologis, sehingga memungkinkan untuk menentukan referensi interval (Llurba *et al.*, 2004). Pengukuran kadar MDA merupakan pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung sebagai indikator stres oksidatif. Pengukuran ini dilakukan dengan tes *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARs) (El-Bahr, 2013).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang dapat menetralkan radikal bebas dengan cara menerima atau mendonorkan satu elektron untuk menghilangkan kondisi “elektron tidak berpasangan” (Muchtadi, 2013). Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Lie *et al.*, 2013).Antioksidan menangkal radikal bebas dengan cara mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas yang baru, menginaktivikasi radikal

dan memotong propagasi serta memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Hamid *et al.*, 2010). Konsumsi antioksidan dari luar, dapat menghambat atau memperlambat pembentukan radikal bebas dan ROS pada tahap awal pembentukannya (tahap inisiasi) dan memutus rantai reaksi radikal pada tahap propagasi sewaktu terjadi oksidasi lipid. Fungsi tersebut dapat aktif melalui mekanisme bahwa antioksidan bertindak sebagai senyawa pendonor hidrogen, sebagai pengikat atau *chelator* ion-ion metal dan sebagai *quenchers* singlet oksigen (Muchatadi, 2013). Tanaman yang memiliki vitamin (C, E, *karotenoid*), flavonoid (*flavon, isoflavon, flavonones, anthocyanin* dan *catechin*), polifenol (asam ellagic, asam galat, dan tanin) memiliki aktivitas antioksidan yang luar biasa (Kumar *et al.*, 2012; Krisnadi, 2015).

Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan dapat digolongkan menjadi 3 kelompok yaitu:

1. Antioksidan Primer (Antioksidan Endogenous)

Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatik, yang terbentuk di dalam tubuh. Antioksidan primer bekerja dengan memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer ini bekerja dengan cara mencegah terbentuknya senyawa radikal baru atau mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang reaktif. Yang termasuk antioksidan primer yaitu *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* (CAT), *Glutation Peroksidase* (GPx) (Agarwal *et al.*, 2012; Winarsih, 2011; Muchtadi, 2013). Enzim SOD mempunyai peranan penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas ROS yang dapat menyebabkan stres oksidatif. Enzim SOD bekerja dengan mengkatalisis reaksi dismutase dari

radikal anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). SOD sudah ada di dalam tubuh namun memerlukan bantuan zat-zat gizi mineral (ko faktor) seperti mangan (Mn), seng (Zn), dan tembaga (Cu) agar dapat bekerja (Winarsih, 2011). Enzim katalase adalah enzim yang mengandung *heme* yang mengkatalisis dismutase hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2), enzim ini bergantung pada besi (Fe). Enzim *glutathion peroksidase* (GPx) dan *glutathion reductase* merupakan enzim yang mengandung selenium (Se) pada sisi aktifnya. Enzim ini mengubah molekul hidrogen peroksida dan berbagai hidro serta lipid peroksida menjadi air.

Tabel 2.2 Macam-Macam Enzim Antioksidan

Enzim Antioksidan	Nama Kimia	Penangkap Agen Oksidan	Karakteristik
SOD	Superoksida dismutase	O_2^-	Mengkatalisis konversi O_2^- menjadi O_2 dan mengurangi senyawa reaktif seperti H_2O_2
GSH-Px	Glutathion peroksidase	H_2O_2	Mengkatalisis H_2O_2 menjadi air dan molekul oksigen
CAT	Katalase	H_2O_2	Mengkatalisis H_2O_2 menjadi air dan molekul oksigen

(Rodrigo, 2009)

2. Antioksidan Sekunder (Antioksidan Eksogenous)

Antioksidan sekunder atau disebut juga antioksidan eksogenous atau non enzimatis. Antioksidan ini disebut juga pertahanan preventif. Dalam sistem pertahanan ini, terbentuknya ROS dihambat dengan pengkelatan logam atau dirusak pembentukannya yang terjadi di cairan ekstraseluler. Antioksidan ini yang berfungsi untuk menangkap senyawa oksidan serta mencegah terjadinya reaksi berantai (Hamid *et al.*, 2010). Akibatnya radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Antioksidan sekunder berasal dari bahan makanan seperti vitamin C, E, A dan β -karoten, flavonoid, isoflavon, flavon, antosianin, katekin, isokatekin, serta asam lipoat. Antioksidan non enzimatik juga banyak

ditemukan dalam sayuran maupun buah-buahan, biji-bijian, serta kacang-kacangan.

3. Antioksidan Tersier

Antioksidan ini meliputi sistem enzim DNA *repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Winarsih, 2011).

2.4 Brokoli

2.4.1 Klasifikasi Brokoli

Klasifikasi brokoli menurut Dalimartha (2015) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Capparales</i>
Famili	: <i>Brassicaceae</i>
Genus	: <i>Brassica</i>
Spesies	: <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>



Gambar 2.5 Brokoli (*Brassica oleracea*) (Dalimartha, 2015)

2.4.2 Kandungan Gizi dan Zat Aktif Brokoli

Brokoli (*Brassica oleracea* L var *italica*) merupakan sayuran yang banyak dikonsumsi masyarakat. Brokoli banyak mengandung vitamin seperti vitamin A, B1, B2, B5, B6, dan E. Selain itu brokoli juga mengandung unsur Ca, Zn, Mg, Fe dan senyawa antioksidan (Gad dan El-moez, 2011). Nilai gizi brokoli dalam 100 gram terdapat pada tabel 2.2. Komponen antioksidan brokoli terdiri atas karotenoid dan sejumlah fitokimia. Karotenoid adalah pigmen alami yang terdiri dari klorofil, lutein, dan beta karoten. Sedangkan fitokimia pada brokoli terdiri atas glucorapharin, sulforaphan, glucobrassicin, 13C (indol-3-carbinol), glucoerucin, glucoiberin, asam-D-glutaric, asam caffeic, quercetin, asam alpha-lipoic, dan lignan (Lingga, 2010). Kandungan kalsium brokoli sekitar 56 mg atau setara dengan 5,1% kecukupan kalsium yang dianjurkan. Jika dibandingkan dengan jenis sayuran hijau lain kandungan kalsium brokoli lebih rendah, namun dalam proses penyerapannya dapat dikatakan hampir semua kalsium akan diserap dengan sempurna. Hal ini dikarenakan kandungan asam oksalat pada brokoli yang dapat menghambat penyerapan kalsium lebih rendah dibandingkan dengan sayuran hijau lainnya. Kandungan vitamin C pada brokoli adalah 87 mg atau setara dengan 116% kecukupan vitamin C yang dianjurkan sehari. Sedangkan kandungan asam folat brokoli adalah 90 mg setara dengan 22,5% kecukupan asam folat yang dianjurkan sehari (Ramayulis, 2015).

Tabel 2.3 Kandungan Zat Gizi dari 100 gram Brokoli Mentah (Krisnawati, 2016)

Kandungan zat gizi	Jumlah	Kandungan zat gizi	Jumlah
Karbohidrat	6,64 gram	Niacin (B3)	0,639 mg
Gula	1,7 g	Asam Pantotenat (B5)	0,573 mg
Serat	2,6 g	Vitamin B6	0,175 mg
Lemak	0,37 g	Folate (B9)	63 µg
Protein	2,82 g	Vitamin C	89,2 mg
Vitamin A	31 µg	Vitamin E	0,78 mg
Beta Karoten	361 µg	Vitamin K	101,6 µg
Lutein, Zeaxantin	1121 µg	Kalsium	47 mg
Ribovlavin (B2)	0,117 mg	Magnesium	21 mg
Fosfor	66 mg	Seng	0,41 g

Brokoli dikenal sebagai *Crown Jewel of Nutrition* karena memiliki berbagai zat gizi penting seperti vitamin, mineral, metabolit sekunder dan serat (Mahdu dan Kochhar, 2014). Menurut Kusuma *et al* (2017) brokoli mengandung senyawa bioaktif seperti beta karoten, vitamin C, E, dan A, karotenoid, dan polifenol terutama flavonoid yang merupakan antioksidan alami. Skrining fitokimia yang dilakukan oleh Lutfiyati *et al* (2017) menunjukkan bahwa ekstrak etanol brokoli mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan steroid. Penelitian yang dilakukan oleh Lutfita (2012) menunjukkan bahwa kandungan flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi brokoli hasil maserasi lebih baik dibandingkan dengan hasil refluks. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin besar (Lutfita, 2012).

Tabel 2.4 Hasil Pengamatan Kadar Flavonoid Total dan IC_{50}

Pengujian	Kadar Flavonoid Total ($\mu\text{g/ml}$)	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ekstrak metode maserasi		
Ekstrak	43,67	3,63
Fraksi air	33,08	8,36
Fraksi etil asetat	21,25	11,78
Fraksi n-heksan	9,75	52,33
Ekstrak metode refluks		
Ekstrak	33,25	33,84
Fraksi air	18,83	43,78
Fraksi etil asetat	11,25	238,95
Fraksi n-heksan	9,33	173,52

Lutfita (2012)

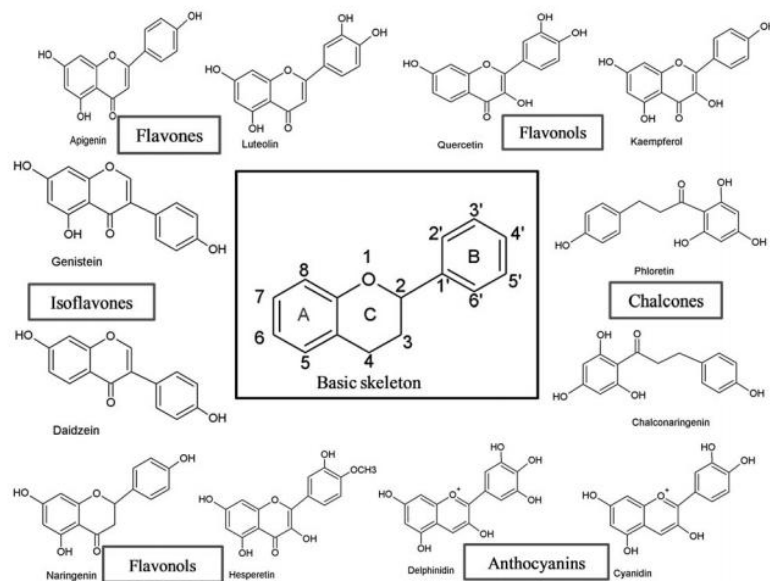
2.4.3 Brokoli sebagai Antioksidan

Antioksidan utama yang terdapat pada buah dan sayur adalah vitamin C, vitamin E, karotenoid dan polifenol khususnya flavonoid, dimana semua komponen tersebut dapat memberikan perlindungan terhadap radikal bebas (Monero *et al.*, 2010). Terdapat konsensus umum yang menyatakan bahwa sayuran jenis *cruciferous* termasuk brokoli, kembang kol, kubis dan lobak memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Diantara sayuran tersebut brokoli menjadi sayuran yang sering digunakan dalam penelitian karena sifat

antioksidannya yang potensial. Kandungan vitamin, mineral, flavonoid, dan karotenoid yang terkandung dalam brokoli dapat menurunkan resiko stress oksidatif di dalam tubuh (Kaur *et al.*, 2007; Latte *et al.*, 2011). Flavonoid dan turunannya adalah kelompok polifenol terbesar yang memiliki aktivitas antioksidan kuat karena kemampuannya dalam menangkap spesies oksigen reaktif dan menghambat stres oksidatif (Jo *et al.*, 2016).

2.4.4 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu dari kelompok senyawa fenolik terbesar yang ditemukan di alam, terutama dapat ditemukan di buah dan sayur. Flavonoid ini merupakan bagian dari golongan polifenol dan merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penangkap radikal hidroksi dan superoksida sehingga melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Diantara sifat-sifat utama yang dapat menjelaskan potensi manfaat kesehatan dari flavonoid adalah aktivitas antioksidannya (Puspitasari, 2016).



Gambar 2. 6 Struktur Kerangka Dasar Flavonoid dan Kelasnya (Panche *et al.*, 2016)

Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, dan kalkon. Senyawa flavonoid *in vitro* telah terbukti merupakan inhibitor yang kuat pada lipid peroksidasi, menangkap senyawa oksigen atau nitrogen (ROS atau RNS), menghambat kerusakan hem protein dan pengikatan ion logam. Kekuatan aktivitas antioksidan flavonoid bergantung pada jumlah dan posisi dari gugus OH yang terdapat pada molekul. Semakin banyak substansi gugus hidroksi pada flavonoid, maka aktivitas antioksidannya semakin besar (Puspitasari, 2016). Senyawa flavonoid merupakan senyawa antioksidan yang berpotensi lebih kuat dibandingkan vitamin C dan E (Winarsi, 2007).

Konfigurasi cincin B hidroksil pada flavonoid merupakan penentu paling signifikan dari penangkapan ROS dan RNS dengan menyumbangkan hidrogen dan elektron untuk radikal hidroksil, peroksil, dan peroksinitrit, stabilisasi radikal bebas, dan menimbulkan radikal flavonoid yang relatif stabil. Mekanisme aksi antioksidan dapat mencakup: (1). menekan pembentukan ROS baik dengan menghambat enzim atau dengan mengkelat ion logam yang terlibat dalam pembentukan radikal bebas (2). *Scavenger* atau sebagai penangkap ROS (3). Peningkatan regulasi atau perlindungan pertahanan antioksidan. Flavonoid menghambat enzim yang terlibat dalam generasi ROS seperti *monooxygenase mikrosomal*, *glutathione S-transferase*, *mitochondrial succinoxidase*, *NADH oxidase* (Kumar dan Pandey, 2013).

2.5 *Rattus norvegicus*

Penelitian dengan menggunakan tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) lebih banyak dilakukan oleh peneliti karena banyak yang menganggap aspek perilaku dan fisiologi tikus lebih relevan dengan manusia dan lebih mudah

diamati, mudah dipelihara bila dibandingkan mencit. Pemeliharaan dan makanan tikus lebih mahal daripada mencit, tetapi tikus dapat berbiak sebaik mencit. Hewan ini juga lebih besar daripada mencit sehingga untuk beberapa macam percobaan, tikus lebih menguntungkan. Terdapat beberapa galur tikus yang dapat digunakan untuk percobaan antara lain: *Wistar albino*, *Long-Evans*, *Sprague Dawley*, namun yang sering digunakan secara luas adalah tikus Wistar albino (Widiartini *et al.*, 2013).

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Rattus norvegicus* strain wistar, yang merupakan tikus yang sering digunakan sebagai hewan coba. Tikus wistar memiliki ciri: kepala lebar, telinga panjang, dan memiliki ekor panjang (tidak melebihi panjang tubuhnya) (Estina, 2011). Tikus wistar memiliki ukuran yang lebih besar dari mencit, lebih cerdas, tenang, mudah diberi perlakuan (Syamsudin dan Darmono, 2011). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki beberapa keunggulan antara lain penanganan dan pemeliharaan mudah, umur relatif pendek, sifat reproduksi menyerupai mamalia, lama kebuntingan singkat, angka kelahiran tinggi, siklus estrus pendek, dan karakteristik tiap fase siklus jelas (Nursyah, 2012).



Gambar 2.7 *Rattus norvegicus wistar* (Estina, 2010)

Tikus betina mencapai usia dewasa setelah berumur 8 minggu dengan berat badan berkisar antara 200-300 gram. Pada umur tersebut tikus sudah siap untuk dikawinkan. Periode kebuntingan tikus berkisar 21-22 hari. Masa produktifnya cukup panjang yaitu pada umur 2-14 bulan, selama periode tersebut tikus dapat melahirkan rata-rata 9-12 ekor (Molelo dan Pramono, 2008). Tikus termasuk hewan yang hanya melakukan kopulasi pada malam hari. Tikus betina akan mulai birahi pada pukul 16.00 sampai pukul 22.00, pada hari ketika apusan vagina menunjukkan fase proestrus. Kopulasi biasanya terjadi tiga jam pertama fase estrus. Fertilisasi tikus akan terjadi 7-10 jam sesudah kopulasi setelah itu embrio akan mencapai stadium blastula dalam 3-4,5 hari (Akbar, 2007).

Tabel 2.5 Data Fisiologi dan Reproduksi *Rattus norvegicus*

Fisiologi Umum	
Suhu tubuh	37C°
Tingkat pernafasan	75-115 x / menit
Denyut jantung	260-400 x / menit
Konsumsi air per hari	10-12 ml / 100 g BB
Konsumsi makanan sehari-hari	10 g / 100 g BB
Berat badan lahir	5 g
Kematangan seksual	7 minggu
Berat badan tikus jantan dewasa	450-550 g
Berat badan tikus betina dewasa	250-300 g
Usia berkembang biak	12-16 bulan
Rentang hidup	2,5-3,5 tahun
Data Reproduksi	
Tikus jantan	
Usia siap kawin	8-10 minggu
Berat badan siap kawin	250-300 g
Tikus betina	
Usia siap kawin	8-10 minggu
Berat badan siap kawin	180-225 g
Lama siklus estrus	4-5 hari
Durasi estrus	10-20 jam
Waktu ovulasi	8-11 jam setelah awal estrus
Menopause	15-18 bulan
Gestasi	
Waktu sperma terdeteksi dalam vagina	Hari pertama
Waktu implantasi	Akhir hari ke-5
Lama gestasi	21-23 hari

(Sangupta, 2013)

Tikus betina yang dikawinkan 90% ovum akan dibuahi sperma 3 jam setelah ovulasi (Paccola *et al.*, 2013). Adanya sperma pada apusan vagina atau adanya *vaginal plug* (sumbat vagina) pada saat pengamatan menunjukkan

terjadinya perkawinan. Pada tikus sumbat vagina tidak bertahan lama sehingga tidak menjadi indikator perkawinan yang dapat diandalkan. Deteksi sperma pada apusan vagina merupakan prediktor kehamilan yang sangat baik pada tikus. Pada hari ke 12 kehamilan janin dapat dipalpasi secara akurat dan pada hari ke 13 kehamilan pembesaran perut mulai dapat terlihat (Hamid dan Zakaria, 2013).

2.5.1 Klasifikasi

Akbar (2010) mengklasifikasikan tikus putih sebagai berikut:

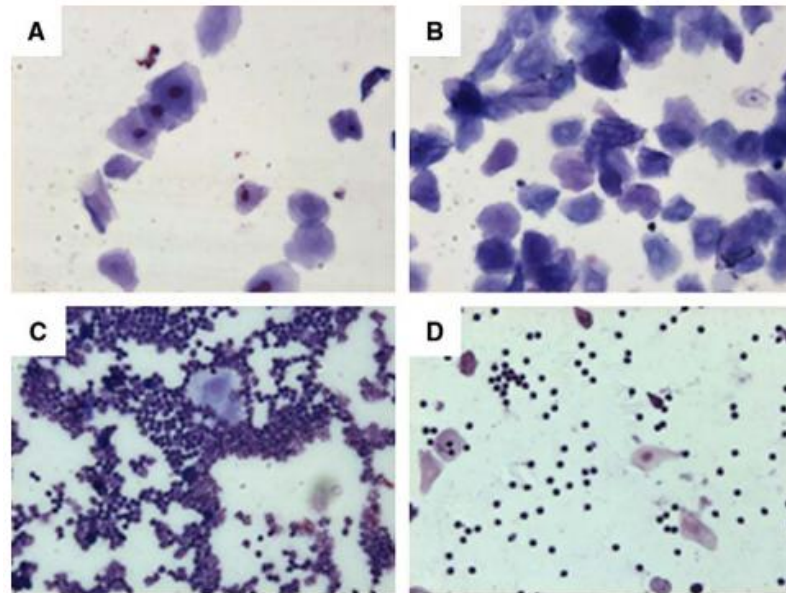
Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Chordata</i>
Kelas	: <i>Mammalia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Subordo	: <i>Odontoceti</i>
Familia	: <i>Muridae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

2.5.2 Siklus Reproduksi

Siklus estrus adalah waktu antara periode estrus. Tikus merupakan hewan poliestrus yaitu hewan yang memiliki siklus birahi lebih dari dua kali dalam satu tahun. Siklus estrus dipengaruhi dan diatur oleh hormon-hormon khusus dalam tubuh dan berlangsung selama 4-6 hari, siklus pertama timbul setelah 1-2 hari dari mulainya pembukaan vagina yang terjadi pada umur 28-29 hari. Siklus estrus terbagi atas 4 periode yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus (Nalley, 2011). Cara yang dapat dilakukan untuk menentukan setiap fase dari siklus estrus adalah sebagai berikut:

1. Metode Sitologi Vagina

Fase siklus estrus ditentukan berdasarkan ada tidaknya leukosit, sel epitel berinti, dan sel epitel kornifikasi pada apusan vagina yang dilihat menggunakan mikroskop.



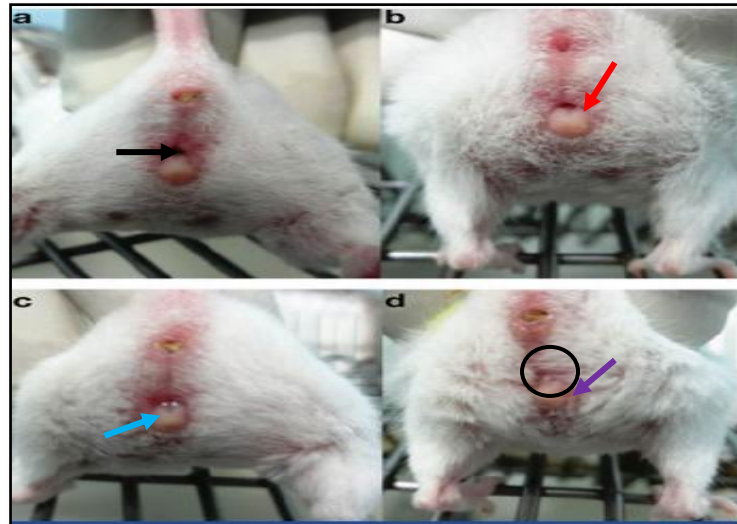
Gambar 2.8 Identifikasi Fase Siklus Estrus

Keterangan: Ulasan vagina dari tikus betina pada fase proestrus (a), estrus (b), metestrus (c), dan diestrus (d). Pada fase proestrus hasil usapan vagina menunjukkan sebagian besar sel epitel berinti dan terdapat beberapa sel epitel kornifikasi. Beberapa leukosit dapat ditemukan pada saat fase proestrus awal. Tahap selanjutnya adalah fase estrus dimana terdapat sebagian besar sel epitel kornifikasi. Jika tidak terjadi kehamilan maka fase metestrus akan dimulai. Tahap metestrus merupakan tahap yang singkat yang ditandai dengan adanya sel epitel kornifikasi dan leukosit polimorfonuklear pada apusan vagina. Selain itu pada fase metestrus akhir akan ditemukan adanya sel epitel berinti. Fase diestrus merupakan fase terpanjang yang berlangsung lebih dari 2 hari dimana pada apusan vagina menunjukkan sebagian besar leukosit polimorfonuklear dan beberapa sel epitel pada diestrus akhir. Leukosit tetap menjadi tipe sel dominan pada fase ini. Siklus ini kemudian akan berulang kembali pada tahap siklus estrus awal (Byers *et al.*, 2012; Meziane *et al.*, 2007).

2. Metode Visual

Metode visual dilakukan dengan memeriksa vagina hewan coba dengan hati-hati pada ruangan yang dilengkapi dengan penerangan yang cukup. Penggunaan lampu LED perlu dihindari pada pemeriksaan ini karena dapat menghasilkan warna ungu yang membuat deteksi menjadi sulit diamati. Tikus

ditahan dengan tangan yang tidak dominan dan ditahan dengan forepaws. Ekor tikus diangkat dengan hati-hati dan dilakukan pemeriksaan pada vagina tikus.



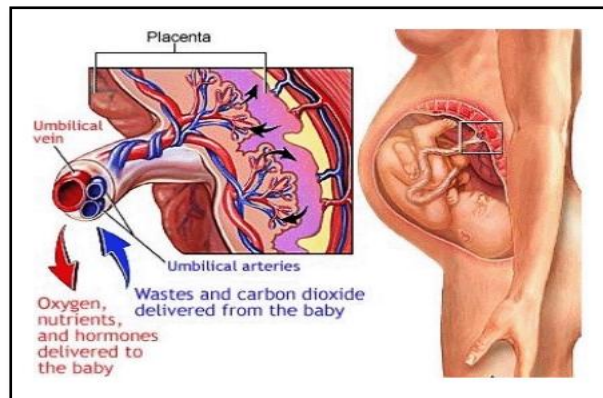
Gambar 2.9 Penampilan Vagina pada Setiap Fase Siklus Estrus: Fase Proestrus (a), Estrus (b), Metestrus (c), Diestrus (d)

Keterangan: Pembukaan vagina lebar (↗), area vagina berwarna merah muda (↗), area vagina berwarna kurang merah muda (↘), debris seluler berwarna putih (↗), pembukaan vagina sangat kecil atau tertutup (○). Pada fase proestrus pembukaan vagina lebar, lembab, dan area sekitar vagina berwarna merah muda, terdapat kerutan/striasi disepanjang tepi dorsal atau ventral vulva. Fase estrus vagina tampak seperti fase proestrus akan tetapi area sekitar vagina berwarna kurang merah muda, kurang lembab, dan striasi lebih jelas pada fase ini. Fase metestrus dicirikan dengan pembukaan vagina kering, pucat, dan adanya debris seluler berwarna putih. Pada fase diestrus pembukaan vagina sangat lembab, sangat kecil bahkan tertutup pada beberapa tikus dan tidak ada pembengkakan jaringan vagina (Ekambaram *et al.*, 2017).

2.6 Plasenta

Plasenta tumbuh secara dramatis dari bulan ketiga kehamilan sampai persalinan, dimana terdapat korelasi antara pertumbuhan plasenta dan pertumbuhan janin. Pada kehamilan aterm plasenta berbentuk oval dan datar, dengan diameter rata-rata 18,5 cm, tebal 23 mm, dan berat plasenta adalah 6% dari berat badan ibu. Berat plasenta meningkat 0,7% per hari diikuti dengan pertambahan berat badan janin 1,5% per hari. Plasenta terletak di depan atau di belakang dinding uterus ke atas ke arah fundus dan terdiri dari 2 bagian yaitu pars maternal dan pars fetal. Pada pars maternal bagian plasenta yang

menempel pada desidua memiliki rata-rata 20 kotiledon. Pada bagian ini merupakan tempat pertukaran darah ibu ke janin. Pada bagian pars fetal terdapat insersi tali pusat (Chestnut *et al.*, 2014; Megasari *et al.*, 2015).



Gambar 2.10 Plasenta

Keterangan: Plasenta memberikan nutrisi dan oksigen pada janin serta membuang limbah seperti karbon dioksida melalui tali pusat (Wang dan Zhao, 2010).

2.6.1 Fungsi Plasenta

Fungsi utama plasenta adalah mempertukarkan produk metabolik dan gas antara sirkulasi ibu dan janin serta menghasilkan hormon (Sadler, 2009):

1. Pertukaran Gas

Pertukaran gas seperti oksigen, karbon dioksida dan karbon monoksida berlangsung melalui difusi sederhana. Aliran darah plasenta sangat penting bagi pasokan oksigen, karena jumlah oksigen yang mencapai janin terutama ditentukan oleh penyaluran bukan difusi.

2. Pertukaran Nutrien, Elektrolit, dan Antibodi

Pertukaran nutrien dan elektrolit misalnya asam amino, asam lemak bebas, karbohidrat dan vitamin berlangsung cepat dan meningkat seiring dengan kemajuan kehamilan. Antibodi berupa IgG disalurkan dari ibu ke janin sehingga janin memperoleh kekebalan pasif terhadap berbagai penyakit infeksi.

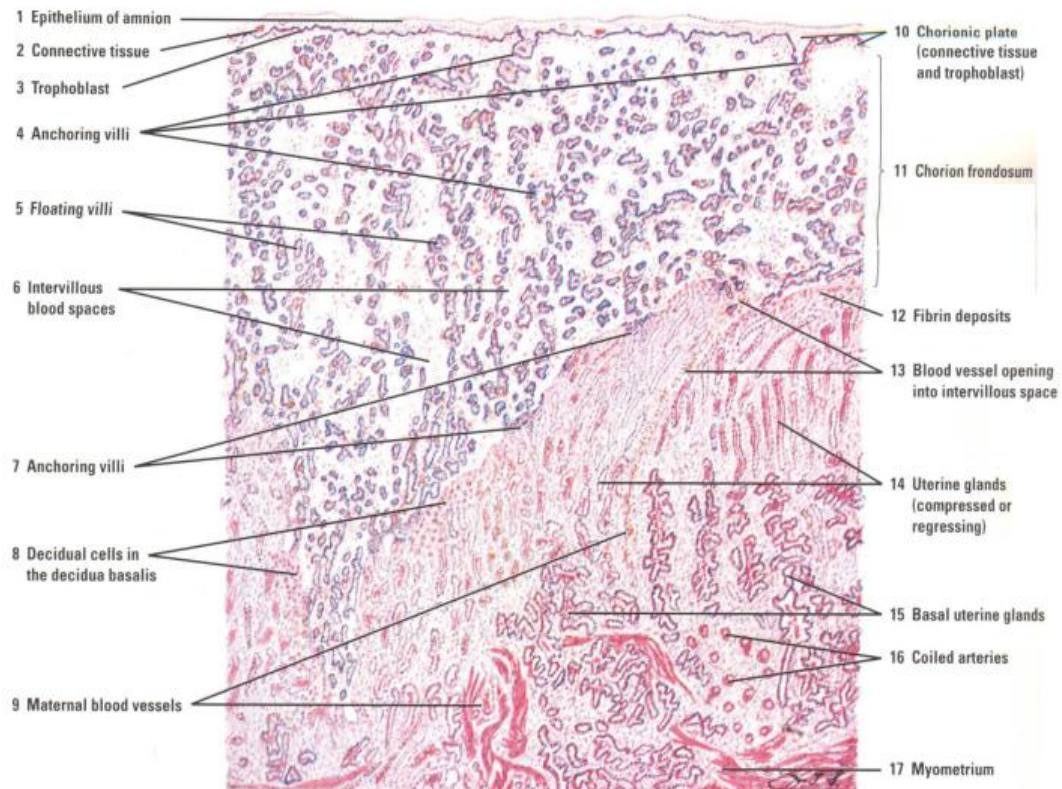
3. Produksi hormon

Selama dua bulan pertama kehamilan sinsitiotrofoblas menghasilkan HCG (*human chorionic gonadotrophin*) yang berfungsi untuk mempertahankan korpus luteum agar memproduksi hormon. Setelah empat bulan maka sinsitiotrofoblas memproduksi sendiri hormon seperti estrogen dan progesteron yang dibutuhkan untuk menunjang kehamilan. Hormon lain yang dihasilkan plasenta adalah HPL (*human placenta lactogen*). HPL mirip hormon pertumbuhan yang memprioritaskan glukosa darah ibu bagi janin dan menstimulasi kelenjar payudara untuk menghasilkan susu.

2.6.2 Sirkulasi Plasenta

Plasenta adalah organ vaskular unik yang menerima pasokan darah dari sistem ibu dan janin sehingga dapat dikatakan terdapat dua sistem sirkulasi darah yang terpisah yaitu sirkulasi darah ibu-plasenta (uteroplasental) dan sirkulasi darah janin-plasenta (fetoplasental). Sirkulasi uteroplasental dimulai dengan aliran darah ke dalam ruang intervillous melalui arteri spiral desidua. Pertukaran oksigen dan nutrisi terjadi ketika darah ibu mengalir di sekitar vili terminal di ruang intervili. Darah arteri ibu yang mengalir masuk mendorong darah terdeoksigenasi ke endometrium dan kemudian ke vena uterus kembali ke sirkulasi ibu. Sirkulasi janin-plasenta memungkinkan arteri umbilikal untuk membawa darah janin yang terdeoksigenasi dan tanpa nutrisi dari janin ke pembuluh darah inti vili. Setelah pertukaran oksigen dan nutrisi, vena umbilical membawa darah segar kaya oksigen dan nutrisi beredar kembali ke sirkulasi sistemik janin (Wang dan Zhao, 2010).

2.6.3 Struktur Histologi Plasenta



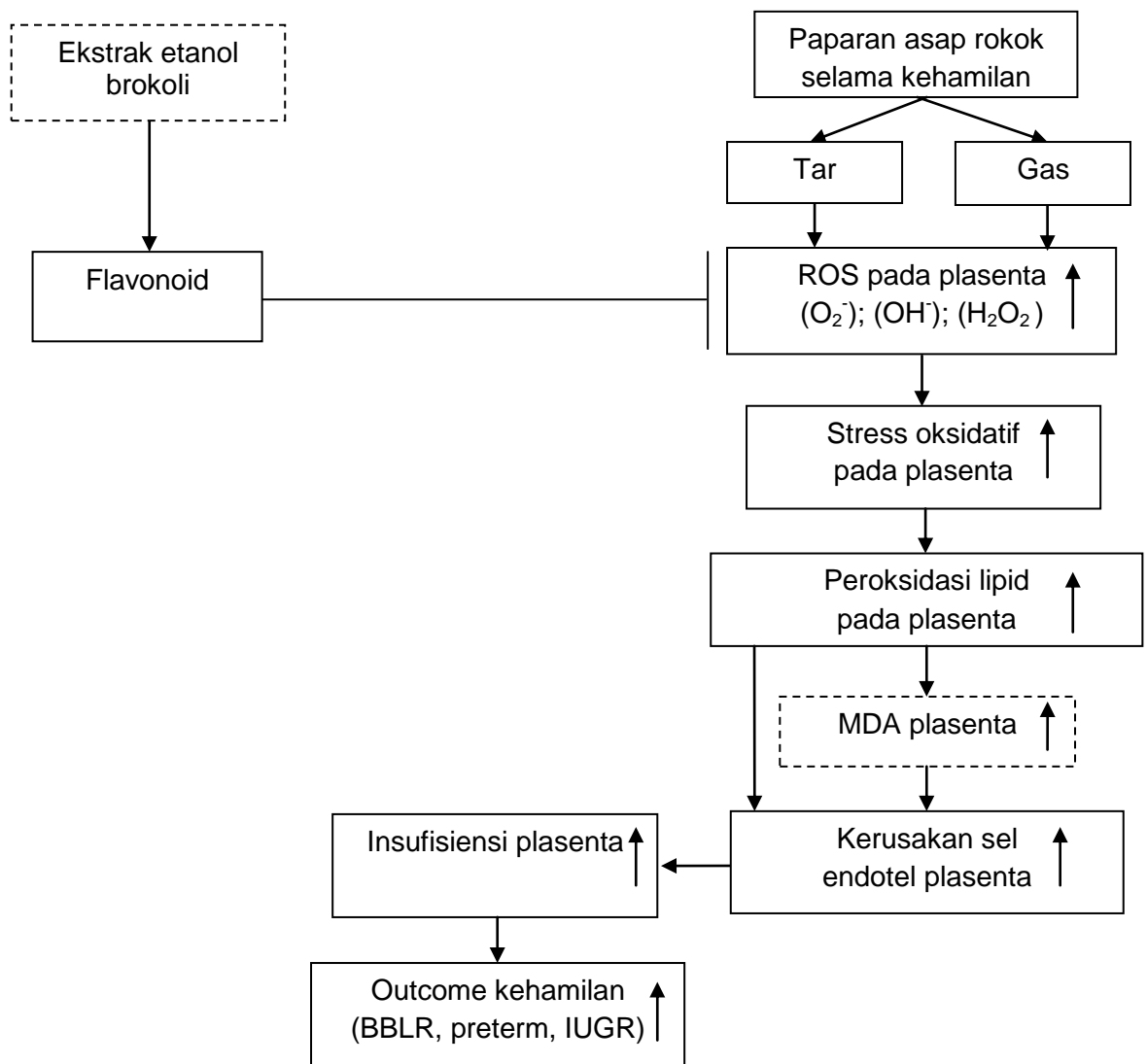
Gambar 2.11 Struktur Histologi Plasenta (Eroschenko, 1996)

Sebagaimana telah diketahui bahwa terdapat empat lapis *barrier* plasenta/sawar plasenta yang mencegah kontak langsung antara darah ibu dan darah janin, antara lain: sinsitium, sitotrofoblas/ *langhans* (derivat trofoblas), jaringan ikat, dan endotel (Sadler, 2010; Cunningham, 2006). Secara histologi, sel endotel janin agak sulit untuk diamati sebab ukuran pembuluh darah yang jauh lebih kecil dibandingkan pembuluh darah ibu yang pada umumnya mudah dikenali, khususnya pembuluh darah yang mengelilingi “pulau trofoblas”.

BAB 3

KERANGKA KONSEPDAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:



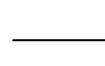
: Variabel yang diteliti



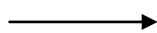
: Meningkat



: Variabel yg tidak diteliti



: Menghambat



: Menyebabkan

Penjelasan Kerangka Konsep:

Berdasarkan penggunaan filter, komponen dalam asap rokok dibagi menjadi dua yaitu komponen gas (bagian yang dapat melewati filter) dan komponen partikel/tar (bagian yang tertinggal dalam filter) dimana kedua komponen tersebut mengandung radikal bebas. Asap rokok dapat menyebabkan peningkatan ROS dalam tubuh termasuk disini ROS pada plasenta seperti anion superoksid (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH^-) (Hamdi *et al.*, 2016). Secara fisiologi tubuh memiliki sistem proteksi terhadap radikal bebas akan tetapi paparan asap rokok yang terjadi secara terus menerus menyebabkan ROS meningkat melebihi kapasitas antioksidan endogen sehingga terjadi ketidakseimbangan antara produksi ROS dengan antioksidan endogen dan kondisi ini disebut sebagai stres oksidatif (Buton dan Jauniaux, 2011).

Protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein serta DNA merupakan target radikal bebas. Asam lemak tak jenuh sebagai komponen utama penyusun membran sel sangat rentan terhadap radikal bebas. Reaksi oksidasi antara ROS dengan asam lemak tak jenuh dari membran sel disebut peroksidasi lipid dan akan menghasilkan produk akhir berupa MDA (*Malondialdehyde*) yang bersifat toksik terhadap sel. Terjadinya peroksidasi lipid pada plasenta dapat menyebabkan kerusakan pada sel endotel plasenta, selain itu produk metabolit yang dihasilkan yaitu MDA juga dapat menyebabkan kerusakan pada sel endotel plasenta (Winarsi, 2007; Tsikas, 2017; Eberhardt, 2001). Kerusakan pada sel endotel plasenta dapat menyebabkan insufisiensi plasenta yaitu terjadinya hambatan dalam distribusi nutrisi dan oksigen pada janin yang akhirnya akan menimbulkan masalah kehamilan seperti berat lahir rendah, pertumbuhan janin terhambat, dan kelahiran preterm (Nelawati *et al.*,

2016; Smith, 2018; Tincani *et al.*, 2016). Tingkat keparahan peroksidasi lipid dapat diketahui melalui pengukuran kadar MDA yang merupakan biomarker stres oksidatif (Sholikhah *et al.*, 2018).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat oksidasi molekul target. Brokoli (*Brassica oleracea*) merupakan salah satu sayuran yang mengandung antioksidan tinggi. Uji fitokimia yang dilakukan oleh Lutfiyati *et al* (2017) menunjukkan bahwa ekstrak etanol brokoli mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan steroid (Lutfiyati *et al.*, 2017). Flavonoid memiliki kapasitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan vitamin C dan E. Flavonoid memiliki kemampuan dalam menangkap spesies oksigen reaktif dan menghambat stres oksidatif. Mekanisme flavonoid dalam menangkai radikal bebas yaitu dengan donor satu atom hidrogen kepada radikal bebas sehingga radikal tersebut menjadi molekul yang stabil (Prochazkova *et al.*, 2011; Jo *et al.*, 2016; Wardani *et al.*, 2016).

Pemberian ekstrak etanol brokoli diharapkan dapat menurunkan kadar MDA plasenta pada tikus bunting yang terpapar asap rokok sehingga kerusakan sel plasenta tidak terjadi dan gangguan kehamilan akibat paparan asap rokok dapat dicegah.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea*) dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) plasenta *Rattus norvegicus* bunting yang terpapar asap rokok.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *True Eksperimental Laboratorium* dengan menggunakan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design* dengan membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan (*post test*) dengan kontrol.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus* bunting yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Kriteria dalam pemilihan sampel adalah sebagai berikut:

Kriteria Inklusi:

- a. Tikus betina bunting
- b. Tikus dalam keadaan sehat yang ditandai dengan pergerakan aktif, bulu tidak rontok, nafsu makan baik, dan tidak cacat.
- c. Usia tikus 8-10 minggu
- d. Berat badan berkisar 180-225 gram

Kriteria Drop Out:

- a. Tikus yang mati selama penelitian berlangsung.
- b. Tikus yang melahirkan terlalu awal yaitu pada trimester 1 dan 2 kebuntingan (hari ke 1-14 kebuntingan)

4.2.2 Jumlah Sampel

Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan. Jumlah replikasi (n) pada setiap kelompok perlakuan (p) dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Notoadmojo, 2010):

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari hasil perhitungan dengan menggunakan rumus tersebut, jika banyak kelompok adalah 5, maka jumlah replikasi atau sampel yang dibutuhkan untuk masing-masing kelompok adalah 4, sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan secara keseluruhan adalah 20 ekor tikus bunting. Dalam penelitian eksperimental dapat terjadi drop out pada hewan coba sebelum penelitian selesai dilakukan. Oleh karena itu diperlukan perhitungan kembali untuk menambahkan sampel cadangan. Berdasarkan rumus sampel terkoreksi kemungkinan adanya sampel drop out sebanyak 10% (0,1), maka jumlah sampel yang dibutuhkan menurut perhitungan rumus adalah (Charan dan Khantaria, 2013)):

$$N = n / (1-f)$$

$$N = 4 / (1-0,1)$$

$$N = 4 / 0,9$$

$$N = 4,44$$

Keterangan:

N: besar sampel koreksi

n: besar sampel awal

f: perkiraan proporsi drop out sebesar 10%

Hasil perhitungan diatas menunjukkan jumlah sampel yang dibutuhkan pada setiap kelompok adalah 5 ekor tikus bunting. Oleh karena itu, dalam penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus bunting yang terbagi dalam 5 kelompok.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Paparan asap rokok dan ekstrak etanol brokoli

4.3.2 Variabel Terikat

Kadar MDA plasenta tikus

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Januari sampai Mei 2019.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

a. Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Pakan hewan coba (pakan standar di Laboraturium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya), air minum berupa air keran, dan sekam untuk alas kandang. Pakan hewan coba dibuat dari campuran tepung terigu, pelet dan air. Pelet yang dipakai tersusun atas protein kasar, lemak kasar, serat kasar, kalsium, fosfor, dan air. Semua bahan-

bahan dicampur dengan perbandingan tepung dan pelet 3:1. Adonan pakan diaduk hingga merata dan tambahkan air secukupnya. Setelah merata adonan tersebut dicetak bulat dengan berat ± 40 gram.

b. Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba

-Rokok: Asap rokok yang dipaparkan berasal dari rokok kretek

Rokok kretek dipilih karena merupakan rokok khas Indonesia dan tingkat peroksidasi lipid yang dihasilkan lebih besar dibandingkan rokok putih.

-Ekstrak etanol brokoli

c. Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Brokoli

-Brokoli dalam bentuk serbuk simplisia yang diperoleh dari UPT Materia Medika, Kota Batu, Malang

-Etanol 96%

d. Bahan untuk Pembedahan Hewan Coba

Ketamin 100 mg/10 ml

e. Bahan untuk Pengukuran Kadar MDA Plasenta

Tri Chloride Acetil Acid (TCA) 15% 250 μ L, Hypochlorite Acid (HCL) 250 μ L, Na-thiobarbituric Acid 1% 200 μ L, PBS pH 7,4, Aquades, dan Plasenta.

4.5.2 Alat Penelitian

a. Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang tikus berupa box plastik berukuran 43 x 35 x 12 cm sebanyak 5 buah, penutup kandang berupa kawat kasa atau kawat berjaring, botol tempat minum tikus, tempat makan tikus, spidol marker untuk penandaan tikus.

b. Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Neraca Ohaus

c. Alat untuk Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli

Timbangan analitik, gelas beker, gelas erlenmeyer, kertas saring whatman 40, *rotatory evaporator*, *water bath*, labu evaporator, pengaduk, corong penyaring, botol hasil ekstrak, sonde.

d. Alat untuk Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Pemaparan asap rokok pada hewan coba menggunakan alat *smooking pump* buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Alat ini berupa kotak yang terbuat dari *fiberglass* yang terdiri dari tiga ruangan dengan ukuran masing-masing 26 x 12 x 12 cm³. Pada setiap ruangan terdapat pipa untuk mengalihkan asap rokok. Ketiga pipa keluar menyatu dengan pipa yang dipasang rokok. Terdapat juga pompa yang berfungsi menghisap asap rokok yang kerjanya dibantu dengan adaptor. Selain itu terdapat dua klep yang secara otomatis dapat membuka dan menutup saat penghisapan dan penutupan asap rokok yang keluar masuk kotak.

e. Alat untuk Pembedahan dan Pengambilan Plasenta

Kapas, scalpel, gunting, pinset, jarum pentul, alas kayu, *handscoon*.

f. Alat untuk Pengukuran Kadar MDA Plasenta

Timbangan, pipet, mortar dingin, tabung reaksi, *centrifuge*, *water bath*, *vortex*, *micropipette*, spektrofotometer.

4.6 Definisi Operasional

No	Definisi Operasional	Skala	Satuan
1	Asap Rokok: asap rokok berasal dari rokok kretek yang dipaparkan 1 batang per hari dengan menggunakan alat <i>smocking pump</i> buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.	Rasio	Batang/hari
2	Ekstrak etanol brokoli: brokoli dalam bentuk simplisia diperoleh dari UPT Materia Medika, Kota Batu, Malang yang selanjutnya dilakukan proses ekstraksi di Laboratorium Farmakologi FKUB. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB.	Rasio	mg/kgBB/hari
3	Kadar MDA plasenta: kadar MDA plasenta diukur dengan metode TBA (<i>thiobarbituric acid</i>) dan pembacaan hasil menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.	Rasio	ng/100 mg

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Proses aklimatisasi atau adaptasi pada hewan coba dilakukan selama satu minggu di Laboratorium Farmakologi FKUB. Adaptasi dilakukan terhadap kondisi air, makanan, dan suhu di dalam laboratorium.

4.7.2 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba dipelihara dalam kandang pemeliharaan berupa box plastik berukuran 43 cm x 35 cm x 12 cm yang ditutup dengan kawat berjaring dimana

masing-masing kandang ditempati 5 ekor tikus bunting. Bagian alas kandang dialasi sekam dengan tebal 1,5-2 cm yang diganti setiap 3 hari sekali pada pagi hari untuk menjaga kebersihan kandang. Pemberian pakan dan minum tikus dilakukan setiap pagi. Kebutuhan pakan standar tikus ± 40 g/ ekor/ hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

4.7.3 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba

Pada saat fase estrus tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan dengan cara menempatkan tikus betina dan tikus jantan dalam satu kandang dengan rasio kawin 2:1. Fase estrus merupakan periode ketika tikus betina menerima tikus jantan untuk bersenggama yang ditandai dengan peningkatan aktivitas tikus, punggung lordosis, telinga selalu bergerak-gerak, dinding vagina kering, dan vulva bengkak. Keesokan harinya dilakukan pemeriksaan untuk melihat ada tidaknya *vaginal plaque*, jika ditemukan adanya *vaginal plaque* maka dihitung sebagai hari ke-0 kebuntingan (Samsuria, 2009; Byers *et al.*, 2012). Tikus yang sudah bunting diberi label (*permanent board marker*) pada bagian ekor lalu dimasukkan kedalam kelompok yang sudah ditentukan kemudian akan mendapat perlakuan. Sedangkan tikus yang belum bunting dikawinkan kembali sama seperti prosedur sebelumnya.

4.7.4 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Dalam penelitian ini terdapat 25 sampel hewan coba yang dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, dimana masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus bunting dengan rincian sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif (K-) = Kelompok tikus bunting yang tidak terpapar asap rokok dan tidak diberi ekstrak etanol brokoli

2. Kelompok kontrol positif (K+) = Kelompok tikus bunting yang terpapar asap rokok dan tidak diberi ekstrak etanol brokoli
3. Kelompok perlakuan 1 (P1) = Kelompok tikus bunting yang terpapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol brokoli dengan dosis 100 mg/kgBB
4. Kelompok perlakuan 2 (P2) = Kelompok tikus bunting yang terpapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol brokoli dengan dosis 200 mg/kgBB
5. Kelompok perlakuan 3 (P3) = Kelompok tikus bunting yang terpapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol brokoli dengan dosis 400 mg/kgBB

4.7.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Brokoli

Brokoli dalam bentuk simplisia yang diperoleh dari UPT Materia Medika, Kota Batu, Malang yang selanjutnya dilakukan proses ekstraksi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan menggunakan pelarut etanol 96%. Penggunaan pelarut etanol 96% mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Lutfiyati *et al* (2017) dimana pelarut etanol 96% mampu melarutkan kandungan alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan steroid (Lutfiyati *et al.*, 2017). Tahapan dalam pembuatan ekstrak etanol brokoli adalah sebagai berikut:

Proses ekstraksi

- a. Serbuk simplisia brokoli ditimbang sebanyak 100 gram lalu direndam dengan larutan etanol 96% (900 ml) pada gelas erlenmeyer ukuran ± 1 L
- b. Dikocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit) dan direndam 1 malam sampai mengendap

- c. Diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring *whatman* no 40)
- d. Proses perendaman ini dilakukan sampai 3 kali

Proses evaporasi

- a. Dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 L
- b. Labu evaporasi dipasang pada evaporator
- c. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh
- d. Suhu *water bath* diatursesuai dengan titik didih pelarut etanol (70⁰ C)
- e. Semua rangkaian alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik
- f. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
- g. Aliran pelarut etanol dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam) ± 900 ml
- h. Oven hasil ekstrak sampai beratnya tetap dengan cara: 1 jam dioven kemudian ditimbang dengan neraca analitik, oven kembali 30 menit kemudian ditimbang, ulangi proses pengovenan selama 30 menit sampai didapatkan berat ekstrak yang tetap. Jika didapatkan berat ekstrak yang tetap itu artinya pelarut sudah teruap
- i. Hasil ekstraksi dimasukkan ke botol plastik/kaca kemudian disimpan dalam freezer

4.7.6 Penentuan Dosis Ekstrak Etanol Brokoli

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Cho *et al* (2006) mengenai efek perlindungan brokoli terhadap kerusakan oksidatif *in vitro* dan *in vivo*, menunjukkan bahwa ekstrak etanol brokoli dengan dosis 100 mg/kgBB dan 200mg/kgBB dapat memberikan efek perlindungan terhadap terjadinya kerusakan

oksidatif (Cho *et al.*, 2006).Oleh karena itu dalam penelitian ini dosis ekstrak etanol brokoli yang diberikan adalah 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB. Cara menghitung dosis ekstrak etanol brokoli yang diberikan pada tikus adalah sebagai berikut:

$$\frac{\text{BB tikus (gram)}}{1000 \text{ gram}} \times \text{dosis yang ditentukan}$$

Perhitungan pemberian ekstrak etanol brokoli dengan berat tikus 200 gram:

- Dosis 1 : $\frac{200 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 100 = 20 \text{ mg}/200 \text{ grBB} = 0,02 \text{ gr}/200 \text{ grBB}$
- Dosis 2 : $\frac{200 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 200 = 40 \text{ mg}/200 \text{ grBB} = 0,04 \text{ gr}/200 \text{ grBB}$
- Dosis 3 : $\frac{200 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 400 = 80 \text{ mg}/200 \text{ grBB} = 0,08 \text{ gr}/200 \text{ grBB}$

Volume pengenceran untuk setiap dosis diberikan sebanyak 1 ml dan larutan stock dibuat setiap 5 hari.

$$\begin{aligned} \text{Volume kebutuhan larutan stock} &= \text{volume sonde (ml)} \times \text{jumlah tikus} \times \text{lama (hari)} \\ &= 1 \times 5 \times 5 \\ &= 25 \text{ ml aquades} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi larutan stock dosis 100 mg/kgBB} &= \text{dosis} \times \text{jumlah tikus} \times \text{lama (hari)} \\ &= 0,02 \times 5 \times 5 \\ &= 0,5 \text{ gram dilarutkan dalam 25 ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi larutan stock dosis 200 mg/kgBB} &= \text{dosis} \times \text{jumlah tikus} \times \text{lama (hari)} \\ &= 0,04 \times 5 \times 5 \\ &= 1 \text{ gram dilarutkan dalam 25 ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi larutan stock dosis 400 mg/kgBB} &= \text{dosis} \times \text{jumlah tikus} \times \text{lama (hari)} \\ &= 0,08 \times 5 \times 5 \\ &= 2 \text{ gram dilarutkan dalam 25 ml} \end{aligned}$$

4.7.7 Pemberian Ekstrak Ekstrak Etanol Brokoli

Ekstrak etanol brokoli diberikan pada hari ke-1 kebuntingan sampai hari ke-19 kebuntingan. Pemberian ekstrak etanol brokoli dilakukan dengan menggunakan sonde dengan cara sebagai berikut:

1. Pasang sonde pada ujung spuit 3 cc dan masukkan ekstrak etanol brokoli ke dalam spuit.
2. Pegang bagian tengkuk tikus dengan hati-hati, kemudian masukkan sonde ke dalam mulut tikus melalui langit-langit secara perlahan sampai ke lambung.
3. Dorong ekstrak etanol brokoli yang sudah ada dalam spuit ke dalam lambung tikus.
4. Tikus dapat dikembalikan lagi ke kandang.

4.7.8 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Pemaparan asap rokok dilakukan mulai hari ke-7 sampai hari ke-19 kebuntingan dengan pemaparan 1 batang per hari yang dilakukan setelah pemberian ekstrak etanol brokoli. Waktu yang diperlukan untuk pemaparan 1 batang rokok adalah sekitar 7,5 menit. Cara pemaparan asap rokok berdasarkan standar pemaparan asap rokok Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya adalah sebagai berikut:

1. Menimbang berat badantikus terlebih dahulu dengan menggunakan neraca *Ohaus* sebelum pemaparan asap rokok.
2. Membersihkan tempat pemaparan dari kotoran dan sisa asap serta membersihkan *smoking pump* dari nikotin yang masih melekat.
3. Memeriksa power dan *self voltage*.

4. Memasukkan tiga ekor tikus *Rattus norvegicus* bunting ke dalam kotak *fiberglass* kemudian ditutup.
5. Setiap pemaparan asap rokok dilakukan dengan menjalankan pompa selama 7,5 menit untuk 1 batang rokok, kemudian alat dimatikan, tutup dibuka, dan selanjutnya tikus *Rattus norvegicus* bunting dipindahkan ke kandang semula.
6. Setiap pemaparan berikutnya kotak harus dibersihkan terlebih dahulu dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya.
7. Pompa tetap dijalankan tanpa rokok untuk mengeluarkan sisa asap dan tahapan diatas diulang untuk kelompok tikus berikutnya.

4.7.9 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Plasenta

Pada hari ke-20 kebuntingan dilakukan pembedahan untuk mengambil organ plasenta. Sebelum pembedahan, tikus diterminasi dengan injeksi ketamin 0,1 ml pada paha secara IM dan ditunggu sampai tidak bergerak (AVMA, 2013). Tikus yang sudah mati diletakkan diatas papan dengan abdomen menghadap ke atas dan dilakukan fiksasi pada keempat ekstremitas dengan menggunakan jarum pentul. Kemudian dinding perut dibuka menggunakan gunting dan pinset dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah selanjutnya diafragma dibuka. Selaput janin dibuka dengan hati-hati kemudian janin dipisahkan dengan plasenta. Plasenta dibersihkan dengan PBS (*Phospat Buffered Saline*) pH 7,4 untuk menghilangkan darah dan gumpalan darah kemudian dimasukkan ke dalam plastik yang sudah diberi label dan diletakkan dalam freezer.

Proses pembedahan dan pengambilan plasenta dilakukan oleh petugas laboratorium. Induk tikus dan anaknya yang sudah mati dan tidak digunakan

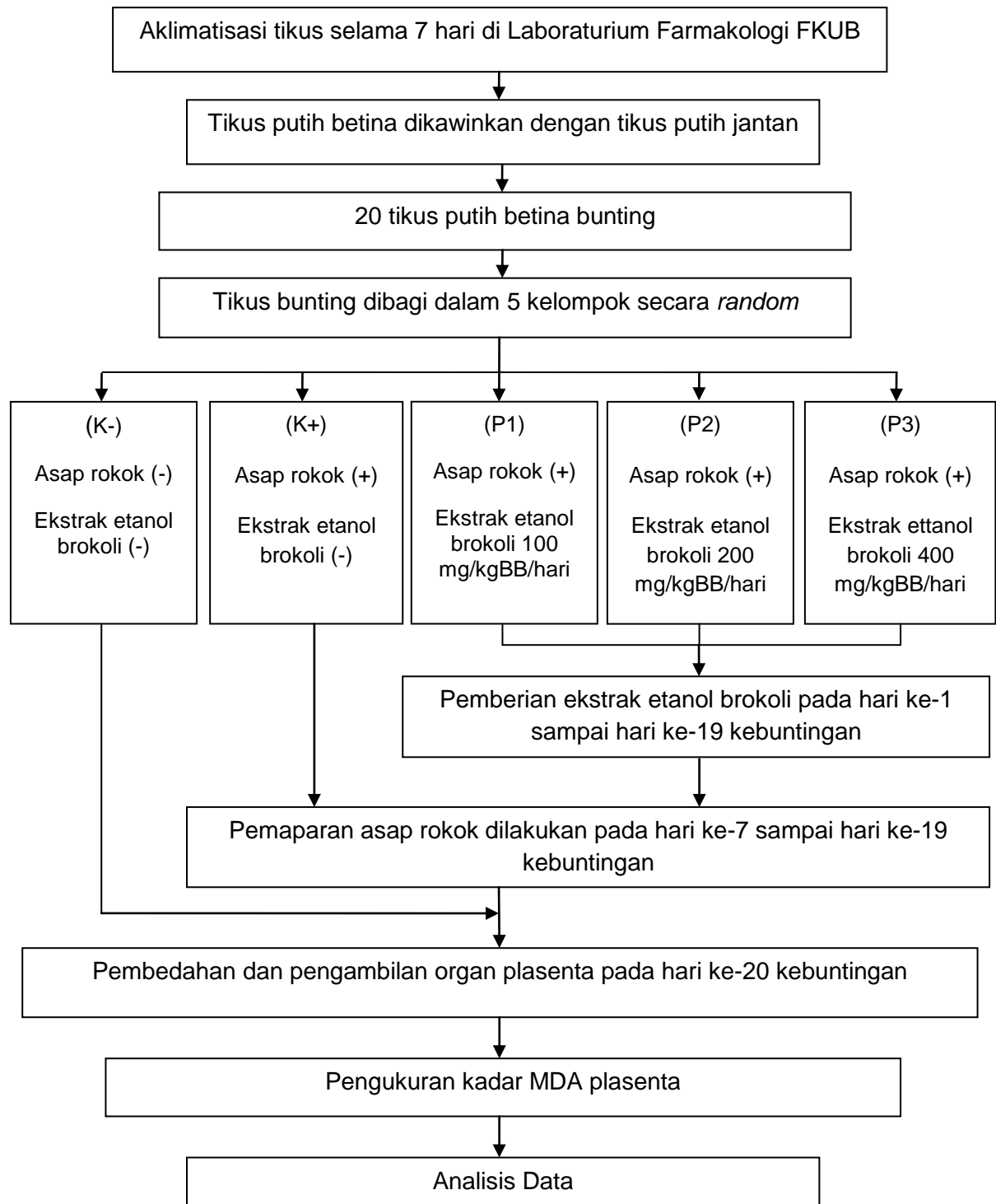
dikubur dengan aman. Penguburan induk dan anak tikus dilakukan oleh petugas laboratorium sesuai prosedur standar yaitu dikubur di dalam tanah tanpa dibalut kain, plastik, maupun wadah dengan kedalaman tanah minimal 50 cm dan luas lubang 0,25 m² agar tidak terjadi pencemaran lingkungan.

4.7.10 Prosedur Pengukuran Kadar MDA Plasenta

Setelah semua sampel plasenta terkumpul selanjutnya dilakukan pengukuran kadar MDA plasenta di Laboratorium Farmakologi FKUB. Prosedur dalam pengukuran kadar MDA plasenta adalah sebagai berikut:

1. Plasenta sebanyak 200 mg dipotong kecil-kecil kemudian digerus sampai homogen dalam mortar dingin.
2. Tambahkan 2 cc PBS kemudian lakukan homogenasi dan bagi menjadi 1 cc pada tabung kontrol (sebagai standar) dan 1 cc pada tabung tes.
3. Tambahkan 15% TCA 250 μ L dan 250 μ L HCL pada tabung kontrol kemudian homogenasikan menggunakan vortex.
4. Tambahkan 15% TCA 250 μ L, 250 μ L HCL, dan 200 μ L Na-Thiobarbituric acid 1% pada tabung tes kemudian homogenasikan menggunakan vortex.
5. Panaskan kedua tabung (tabung kontrol dan tabung tes) ke dalam waterbath dengan temperatur 105⁰C selama 15 menit.
6. Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit kemudian angkat dan biarkan pada suhu kamar.
7. Supernatan diambil dan dipindahkan pada tabung reaksi baru.
8. Pada masing-masing tabung tambahkan 3 cc aquades kemudian baca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Hasil pengukuran MDA plasenta tikus antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS 17,0 for Window XP dengan tingkat signifikansi $\alpha = 0,05$. Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

1. Uji Normalitas Data: uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat normal atau tidak. Hal ini dikarenakan pemilihan data dan uji hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Jika data terdistribusi secara normal maka menggunakan mean dan standar deviasi dan jika terdistribusi tidak normal maka menggunakan median dan minimal-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran pada penyajian data. Uji normalitas data menggunakan Saphiro-Wilk (jumlah sampel ≤ 50). Pembacaan hasil uji normalitas dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik p-value, bila $p > 0,05$ maka disimpulkan data terdistribusi normal. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal maka menggunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal maka menggunakan uji non parametrik.
2. Uji Homogenitas Varian: uji ini bertujuan untuk menguji ANOVA berlaku atau tidak, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen atau sama. Uji homogenitas varian menggunakan *Levene's test*. Pembacaan hasil dengan nilai signifikansi $> 0,05$ dapat dikatakan varian data homogen. Jika varian homogen maka ANOVA dapat digunakan.
3. Uji One Way ANOVA: uji ini bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui terdapat minimal dua kelompok yang berbeda signifikan.

4. Post Hoc Test (Uji Tukey-HSD): uji ini bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil uji tes ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey-HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).
5. Uji Korelasi *Pearson*: untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik). Pada uji korelasi *Pearson*, bila didapatkan:
 - 1) Sig (p) $> 0,05$: tidak ada korelasi antara dua variabel
 Sig (p) $< 0,05$: ada korelasi antara dua variabel
 - 2) Arah korelasi positif (+) : searah, semakin besar nilai suatu variabel, semakin besar juga nilai variabel lainnya.
 Arah korelasi negatif (-) : berlawanan arah, semakin besar nilai suatu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.
 - 3) Kekuatan korelasi bernilai 0 :tidak ada korelasi
 Kekuatan korelasi bernilai 0 - $< 0,2$:korelasi sangat lemah
 Kekuatan korelasi bernilai 0,2 - $< 0,4$:korelasi lemah
 Kekuatan korelasi bernilai 0,4 - $< 0,6$:korelasi sedang
 Kekuatan korelasi bernilai 0,6 - $< 0,8$:korelasi kuat
 Kekuatan korelasi bernilai 0,8 – 1 :korelasi sangat kuat (Dahlan, 2015).

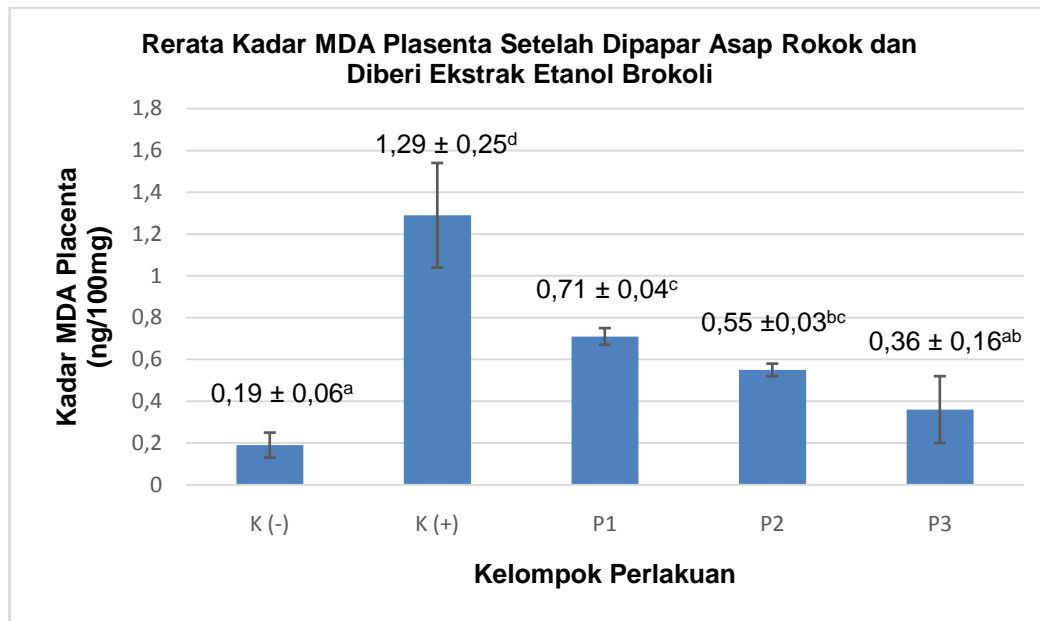
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA plasenta tikus bunting yang terpapar asap rokok. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* bunting sejumlah 25 ekor yang terbagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok tikus bunting tanpa perlakuan (K (-)), kelompok tikus bunting dengan paparan asap rokok (K (+)), kelompok tikus bunting dengan paparan asap rokok dan ekstrak etanol brokoli 100 mg/kgBB (P1), kelompok tikus bunting dengan paparan asap rokok dan ekstrak etanol brokoli 200 mg/kgBB (P2), kelompok tikus bunting dengan paparan asap rokok dan ekstrak etanol brokoli 400 mg/kgBB (P3).

Pemberian ekstrak etanol brokoli dimulai hari ke-1 sampai hari ke-19 kebuntingan. Sedangkan paparan asap rokok dilakukan mulai hari ke-7 sampai hari ke-19 kebuntingan. Pada hari ke-20 kebuntingan dilakukan pembedahan dan pengambilan organ plasenta tikus. Plasenta dimasukkan dalam plastik yang sudah diberi label dan disimpan dalam freezer. Jika semua sampel plasenta sudah terkumpul selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar MDA plasenta di Laboratorium Farmakologi. Hasil pemeriksaan kadar MDA plasenta pada masing-masing kelompok didapatkan hasil rerata seperti pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Histogram Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli Terhadap Kadar MDA Plasenta Tikus Yang Dipapar Asap Rokok

Keterangan: K (-): tanpa paparan asap rokok dan tanpa pemberian ekstrak etanol brokoli; K (+): dipapar asap rokok dan tanpa pemberian ekstrak etanol brokoli; P1: dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol brokoli dosis 100 mg/kgBB; P2: dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol brokoli dosis 200 mg/kgBB; P3: dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol brokoli dosis 400 mg/kgBB.

Berdasarkan histogram diatas menunjukkan bahwa rerata kadar MDA plasenta pada kelompok K (-) sebesar 0,19ng/100 mg ± SD 0,06. Rerata kadar MDA plasenta pada kelompok ini merupakan rerata paling rendah jika dibandingkan dengan kelompok K (+), P1, P2, maupun P3. Pada kelompok K (+) terdapat tren kenaikan rerata kadar MDA plasenta dengan hasil 1,29 ng/100 mg ± SD 0,25. Berbeda dengan kelompok K (-), rerata kadar MDA plasenta pada kelompok ini merupakan rerata paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok K (-), P1, P2, dan P3.

Pada kelompok P1 terdapat tren penurunan rerata kadar MDA plasenta yaitu 0,71 ng/100mg ± SD 0,04. Selain itu pada kelompok P2 juga menunjukkan adanya tren penurunan rerata kadar MDA plasenta, lebih rendah jika dibandingkan kelompok P1 dengan hasil 0,55 ng/100 mg ± SD 0,03. Pada

kelompok P3 diperoleh rerata kadar MDA plasenta sebesar 0,36 ng/100mg \pm SD 0,16. Rerata kadar MDA plasenta pada kelompok P3 juga mengalami tren penurunan. Jika dibandingkan dengan rerata kadar MDA plasenta pada kelompok perlakuan ekstrak etanol brokoli yang lain yaitu kelompok P1 dan P2, rerata kadar MDA plasenta pada kelompok P3 merupakan rerata paling rendah.

5.2 Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk menguji kadar MDA plasenta tikus adalah dengan uji *OneWay ANOVA*. Sebelum dilakukan uji *One Way ANOVA* terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk*, sedangkan uji homogenitas varian dilakukan dengan menggunakan uji *Levene*. Dengan bantuan software SPSS didapatkan hasil pengujian normalitas sebagai berikut:

Tabel 5.1 Uji Normalitas

Variabel	p-value	Keterangan
Kadar MDA	0,699	Sebaran Normal

Berdasarkan tabel 5.1 di atas didapatkan p-value = 0,699 ($p > 0,05$). Hasil dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa sebaran data normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian dan diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 5.2 Uji Homogenitas Varian

Variabel	p-value	Keterangan
Kadar MDA	0,133	Homogen

Berdasarkan tabel 5.2 diatas diperoleh p-value = 0,133 ($p > 0,05$). Hasil pengujian ini dapat disimpulkan bahwa variasi data homogen atau sama. Dikarenakan sebaran data normal dan variasi data homogen maka uji *One Way ANOVA* dapat digunakan.

Tabel 5.3 Hasil Uji One Way ANOVA Rerata Kadar MDA Plasenta Tikus

Kelompok	Jumlah Sampel	Rerata Kadar MDA Plasenta \pm SD	p-value
K (-)	4	$0,20 \pm 0,06^a$	0,000
K (+)	4	$1,29 \pm 0,25^d$	
P1	4	$0,71 \pm 0,04^c$	
P2	4	$0,55 \pm 0,03^{bc}$	
P3	4	$0,32 \pm 0,20^{ab}$	

Keterangan: Rerata kadar MDA plasenta \pm SD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Tabel 5.4 Hasil Uji Tukey-HSD Rerata Kadar MDA Plasenta Tikus

Perbandingan		p-value
K (-)	K (+)	0,000*
	P1	0,001*
	P2	0,017*
	P3	0,492
K (+)	P1	0,000*
	P2	0,000*
	P3	0,000*
P1	P2	0,517
	P3	0,019*
P2	P3	0,314

Keterangan: * : berbeda secara signifikan ($p < 0,05$)

Hasil analisis dengan menggunakan uji Oneway ANOVA, didapatkan p-value = 0,000 ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rerata kadar MDA antar kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan, maka dilakukan uji Post Hoc yaitu dengan uji Tukey-HSD.

Hasil uji Tukey-HSD dapat dilihat pada tabel 5.4. Perbandingan antara kelompok K (-) dengan K (+) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok K (-) dengan K (+) ($p = 0,000$) ($p < 0,05$). Hal ini membuktikan bahwa pemaparan asap rokok berdampak pada peningkatan kadar MDA plasenta secara signifikan.

Pada perbandingan antara kelompok K (+) dengan kelompok P1, menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok K (+) dengan kelompok P1 ($p = 0,000$) ($p < 0,05$). Perbandingan antara kelompok K (+) dengan

kelompok P2 juga didapatkan perbedaan yang bermakna ($p = 0,000$) ($p < 0,05$). Selain itu pada kelompok P3 didapatkan hasil yang sama. Jika dibandingkan dengan kelompok K (+) terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok K (+) dengan P3 ($p = 0,000$) ($p < 0,05$). Dari hal tersebut dapat disimpulkan bahwa pada kelompok P1, P2, dan P3 terjadi penurunan kadar MDA plasenta secara signifikan. Penurunan kadar MDA plasenta paling rendah diantara 3 kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) terjadi pada kelompok P3. Hal ini didasarkan pada nilai rerata kadar MDA plasenta pada kelompok P3 lebih rendah dari kelompok P1 dan P2. Perbedaan yang bermakna antara kelompok P1, P2, P3 dengan kelompok K (+) membuktikan bahwa ekstrak etanol brokoli dosis P1 (100mg/kgBB), P2 (200 mg/kgBB), dan P3 (400 mg/kgBB) berdampak pada penurunan kadar MDA plasenta tikus bunting yang terpapar asap rokok. Dosis efektif ekstrak etanol brokoli dalam penelitian ini adalah dosis P3 karena pada dosis ini rerata kadar MDA plasenta mendekati kondisi normal (K (-)) jika dibandingkan dengan dosis P1 dan P2. Selain itu dari uji Tukey HSD tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok P3 dengan kelompok K (-) ($p = 0,492$) ($p > 0,05$).

Untuk mengetahui kekuatan hubungan antara dosis ekstrak etanol brokoli dengan kadar MDA plasenta, maka dilakukan uji korelasi *Pearson*. Dari hasil perhitungan statistik dengan menggunakan uji korelasi *Pearson* didapatkan hasil korelasi = -0,888 yang berarti terdapat hubungan yang sangat kuat antara dosis ekstrak etanol brokoli dengan penurunan kadar MDA plasenta secara signifikan ($p = 0,000$). Arah korelasi bernilai negatif, hal ini menunjukkan bahwasemakin besar dosis ekstrak etanol brokoli yang diberikan, maka semakin rendah kadar MDA plasenta.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Paparan Asap Rokok dan Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli Terhadap Kadar MDA Plasenta Tikus

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA plasenta tikus bunting yang dipapar asap rokok. Asap rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas eksogen yang berbahaya bagi tubuh manusia khususnya bagi ibu hamil. Paparan asap rokok dapat meningkatkan ROS di dalam tubuh dan apabila kondisi ini tidak diimbangi dengan kapasitas antioksidan yang memadai maka dapat memicu terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif ditandai dengan meningkatnya kadar MDA di dalam tubuh. Pemberian ekstrak etanol brokoli pada tikus bunting yang dipapar asap rokok digunakan untuk mengetahui efek proteksi antioksidan dalam ekstrak etanol brokoli terhadap radikal bebas dalam asap rokok.

Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok sampel yang terdiri dari kelompok K (-), K (+), dan 3 kelompok perlakuan dengan dosis ekstrak etanol brokoli yang berbeda (P1 = 100 mg/kgBB; P2 = 200 mg/kgBB; P3 = 400 mg/kgBB). Pada kelompok K (-), yang merupakan kelompok tikus bunting tanpa pemaparan asap rokok dan tanpa pemberian ekstrak etanol brokoli didapatkan hasil rerata kadar MDA plasenta sebesar 0,19 ng/100mg \pm SD 0,06. Rerata kadar MDA plasenta pada kelompok ini merupakan rerata paling rendah jika dibandingkan dengan kelompok lain. Hal ini disebabkan karena pada kelompok K (-) tidak diberikan perlakuan apapun. Kehamilan sendiri merupakan kondisi fisiologis yang ditandai

dengan adanya peningkatan kebutuhan oksigen dan metabolisme. Kondisi ini menyebabkan peningkatan produksi ROS dan memicu terjadinya peroksidasi lipid dengan hasil akhir berupa MDA (*Malondialdehyde*) (Bizon *et al.*, 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Saikumar *et al* (2013) menyatakan bahwa selama kehamilan terjadi peningkatan stres oksidatif dan peroksidasi lipid yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan kadar MDA serum seiring bertambahnya usia kehamilan (Saikumar *et al.*, 2013).

Pada kelompok K (+), kelompok tikus bunting dengan pemaparan asap rokok dan tanpa pemberian ekstrak etanol brokoli didapatkan rerata kadar MDA plasenta sebesar 1,29 ng/100mg \pm SD 0,25. Rerata kadar MDA plasenta pada kelompok ini mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan kelompok K (-) dan merupakan rerata paling tinggi diantara kelompok penelitian. Hasil uji statistik didapatkan adanya perbedaan bermakna antara rerata kadar MDA plasenta K (+) dengan K (-) ($p = 0,000$) ($p < 0,05$). Peningkatan kadar MDA plasenta pada kelompok ini berkaitan dengan perlakuan yang diberikan yaitu paparan asap rokok.

Asap rokok mengandung substansi toksik dan radikal bebas yang berbahaya bagi sel-sel tubuh. Substansi toksik dalam bentuk gas seperti karbon monoksida (CO), hidrogen sianida (HCN), oksida nitrogen, serta zat kimia yang volatil seperti nitrosamin, formaldehid. Zat-zat radikal bebas dalam asap rokok meliputi peroksinitrit, hidrogen peroksida, dan superoksida (Fitria *et al.*, 2013). Bahan-bahan kimia yang terdapat dalam asap rokok dapat masuk ke paru-paru kemudian masuk ke dalam aliran darah. Aliran darah pada maternal terhubung dengan plasenta. Hal ini akan mengakibatkan janin menerima serangkaian zat berbahaya dan beracun dari asap rokok melalui aliran darah maternal (El-Ardat

et al., 2014). Berbagai bahan kimia dari asap rokok seperti nikotin, karbon monoksida, dan cadmium dapat melewati plasenta dan masuk ke jaringan janin. Hal ini disebabkan karena sebagian besar racun tembakau memiliki berat molekul yang rendah dan kelarutan air yang tinggi sehingga dengan mudah dapat melewati plasenta (Mattsson, 2015; Knopik *et al.*, 2012).

Asap rokok dapat memicu terjadinya stres oksidatif yang mengakibatkan peningkatan aktivitas peroksidasi lipid yang ditandai dengan tingginya kadar *malondialdehyde* (MDA) dan rendahnya kadar *superoksida dismutase* (SOD) (Jain *et al.*, 2009). Terjadinya stress oksidatif pada plasenta dan sistem sirkulasi akan mengakibatkan disfungsi dan kerusakan pada sel endotel plasenta (Subakir *et al.*, 2008). Sel endotel merupakan sel yang melapisi dinding bagian dalam pembuluh darah yang memiliki peranan penting dalam sekresi berbagai substansi yang mengatur konstiksi dan relaksasi pembuluh darah (Sargowo, 2015). Adanya disfungsi sel endotel plasenta akan menyebabkan berkurangnya perfusi darah plasenta, sehingga akan menimbulkan terjadinya berat lahir rendah, pertumbuhan janin terhambat, dan kelahiran preterm (Simbolon *et al.*, 2013; Nelawati *et al.*, 2016; Smith, 2018; Tincani *et al.*, 2016).

Penelitian yang dilakukan oleh Aycicek *et al* (2011) mengenai total kapasitas antioksidan dan status oksidan pada jaringan plasenta ibu perokok aktif dan pasif, dimana hasil penelitian menunjukkan bahwa asap rokok dapat menyebabkan ketidakseimbangan antioksidan dalam jaringan plasenta serta dapat menimbulkan stres oksidatif (Aycicek *et al.*, 2011). Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Aydogan *et al* (2013) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan kadar MDA serum antara ibu hamil yang merokok dengan ibu hamil yang tidak merokok (Aydogan *et al.*, 2013). Konsumsi tambahan

antioksidan eksogen sangat diperlukan untuk memperkuat sistem pertahanan antioksidan terhadap radikal bebas sehingga stres oksidatif dan masalah kehamilan akibat paparan asap rokok dapat dicegah.

Pada kelompok perlakuan, yang merupakan kelompok tikus bunting dengan pemaparan asap rokok dan pemberian ekstrak etanol brokoli dengan 3 dosis berbeda (P1 = 100 mg/kgBB, P2 = 200 mg/kgBB, dan P3 = 400 mg/kgBB), didapatkan rerata kadar MDA plasenta masing-masing sebesar 0,71 ng/100 mg \pm SD 0,04; 0,55 ng/100 mg \pm SD 0,03; 0,36 ng/100 mg \pm SD 0,16. Rerata kadar MDA plasenta pada kelompok P1, P2, maupun P3 mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok K (+). Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok P1, P2, P3 dengan kelompok K (+) ($p = 0,000$) ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli dapat menurunkan kadar MDA plasenta pada tikus bunting yang terpapar asap rokok secara signifikan.

Brokoli merupakan sayuran yang kaya akan senyawa antioksidan. Senyawa bioaktif yang terdapat pada brokoli meliputi vitamin C, E, karotenoid, dan senyawa fenolik terutama flavonoid. Vitamin C pada brokoli seperti asam askorbat dan *asam dehydroascorbic* berperan dalam reaksi redoks ruang intra dan ekstraseluler dari mekanisme biologis. Vitamin C mampu melindungi sel terhadap kerusakan dengan menangkap radikal superoksida, hidrogen peroksida, singlet oksigen dan radikal hidroksil, serta bertindak sebagai agen pemecah rantai peroksidasi lipid (Porter, 2012).

Kandungan flavonoid dalam brokoli juga dapat melindungi sistem biologis dari proses oksidatif pada makromolekul seperti karbohidrat, protein, lipid, dan DNA (Prochazkova *et al.*, 2011). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antioksidan

dalam mencegah terjadinya stres oksidatif adalah sebagai *scavenger* ROS melalui donor atom hidrogen sehingga radikal tersebut menjadi stabil. Flavonoid memiliki kemampuan *chelate trace* ion logam seperti Fe^{2+} dan Cu^+ yang memainkan peran penting dalam pembentukan radikal bebas. Ion logam Fe^{2+} dan Cu^+ dapat mengkatalisis pembentukan radikal hidroksil (OH^\cdot) dari hidrogen peroksida yang dapat menyebabkan reaksi berantai radikal bebas yang bersifat merusak. Flavonoid mampu menghambat enzim yang menghasilkan radikal bebas dalam jumlah yang cukup bermakna seperti *xanthine oxidase*, *lipoxygenase*, *protein kinase C*, *siklooksigenase*, *monooxygenase mikrosomal*, *mitochondrial succinoxidase*, dan *NADPH oxidase*. Selain itu flavonoid dapat meningkatkan perlindungan pertahanan antioksidan. Penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al* (2014) pada tikus menunjukkan bahwa quercetin senyawa flavonoid mampu meningkatkan produksi antioksidan enzimatik seperti glutathione-peroxidase (GSH-Px), glutathione reduktase (GR), superoksida dismutase (SOD), dan katalase (CAT) (Banjarnahor dan Artanti, 2014; Prochazkova *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Kumar dan Pandey, 2013). Melalui mekanisme tersebut maka radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dapat dinetralkan sehingga proses peroksidasi lipid tidak terjadi dan kadar MDA plasenta berada dalam kadar normal.

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB dapat menurunkan kadar MDA plasenta pada tikus bunting yang terpapar asap rokok secara signifikan. Dosis efektif ekstrak etanol brokoli dalam penelitian ini adalah 400 mg/kgBB karena pada dosis ini rerata kadar MDA plasenta lebih rendah dari kelompok perlakuan ekstrak yang lain yaitu P1 dan P2. Selain itu berdasarkan uji

Tukey HSD tidak didapatkan adanya perbedaan bermakna rerata kadar MDA plasenta antara kelompok P3 dengan K (+).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sielma *et al* (2016) mengenai efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA hepar tikus yang diinduksi DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)anthracene*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli dosis 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB dapat menurunkan kadar MDA hepar tikus secara signifikan. Flavonoid ekstrak etanol brokoli berfungsi sebagai *chain breaking antioxidant* yang dapat menangkap radikal bebas dan memutus reaksi berantai radikal bebas melalui mekanisme *hydrogen atom transfer* sehingga peroksidasi lipid tidak terjadi (Sielma *et al.*, 2016).

Penelitian yang dilakukan oleh Vania *et al* (2019) mengenai pengaruh ekstrak etanol brokoli terhadap histopatologi aorta tikus hiperlipidemia, didapatkan bahwa ekstrak etanol brokoli dosis 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, dan 700 mg/kgBB dapat menurunkan derajat peradangan dan perdarahan secara bermakna. Pada dosis 500 mg/kgBB dan 700 mg/kgBB dapat menurunkan derajat peradangan dan perdarahan setara dengan kontrol normal, sedangkan pada dosis 250 mg/kgBB belum dapat menurunkan derajat peradangan dan perdarahan setara dengan kontrol normal (Vania *et al.*, 2019). Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Cho Ju Eun *et al* (2006) mengenai efek protektif brokoli pada kerusakan oksidatif akibat induksi agen diabetogenik *streptozotocin* pada tikus, didapatkan hasil bahwa dosis 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar MDA serum secara bermakna (Cho Ju Eun *et al.*, 2006).

Hasil uji korelasi *Pearson* didapatkan adanya hubungan antara pemberian ekstrak etanol brokoli dengan kadar MDA plasenta ($p < 0,05$), dengan nilai

korelasi sebesar -0,888. Hasil tersebut menunjukkan adanya korelasi yang sangat kuat. Arah korelasi bernilai negatif yang berarti semakin besar dosis ekstrak etanol brokoli yang diberikan, maka semakin rendah kadar MDA plasenta.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini proses pengawinan tikus menggunakan tanda *vaginal plaque* sebagai tanda kebuntingan. Namun, tanda ini tidak menjamin tikus akan 100% mengalami kebuntingan. Oleh karena itu diperlukan replikasi sampel lebih banyak untuk menyiasati ketidakpastian kebuntingan hewan coba. Selain itu dalam penelitian ini tidak dilakukan uji fitokimia ekstrak etanol brokoli sehingga tidak dapat diketahui senyawa aktif apa saja yang terkandung dalam ekstrak etanol brokoli yang mempengaruhi penurunan kadar MDA plasenta pada tikus bunting yang terpapar asap rokok.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Setelah dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA plasenta tikus bunting yang terpapar asap rokok didapatkan hasil bahwa:

1. Paparan asap rokok menyebabkan peningkatan kadar MDA plasenta tikus.
2. Pemberian ekstrak etanol brokoli dapat menurunkan kadar MDA plasenta tikus bunting yang terpapar asap rokok.
3. Dosis efektif ekstrak etanol brokoli dalam penelitian ini adalah 400 mg/kgBB.

7.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan dan kesimpulan yang didapat, saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

1. Bagi peneliti selanjutnya
 - a. Diperlukan pemeriksaan vaginal swab untuk memastikan hari ke-1 kebuntingan tikus.
 - b. Diperlukan uji fitokimia ekstrak etanol brokoli sehingga dapat diketahui senyawa antioksidan yang mempengaruhi penurunan kadar MDA plasenta pada tikus bunting yang terpapar asap rokok.
 - c. Dapat meneliti variabel lain seperti gambaran histopatologi plasenta akibat paparan asap rokok dan pemberian ekstrak etanol brokoli, untuk

menambah kepustakaan mengenai efek paparan asap rokok dan ekstrak etanol brokoli pada jaringan plasenta.

2. Pada masyarakat khususnya ibu hamil
 - a. Ibu hamil dapat menggunakan brokoli sebagai pilihan nutrisi yang tinggi antioksidan untuk menetralkan dampak negatif dari paparan asap rokok sehingga dapat menurunkan angka kejadian berat lahir rendah, kelahiran prematur, dan pertumbuhan janin terhambat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., Mellado, A.A., Premkumar, B.J., Shaman, A., dan Gupta Sajal. 2012. The Effect of Oxidative Stress on Female Reproduction: A Review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10 (49): 1-31.
- Akbar, Budhi. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa yang Berpotensi sebagai Bahan Antiinfertilitas*. Adabia Press: Jakarta.
- Ambrose, J.A. dan Barua, R.S. 2004. The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease: An update. *Journal of the American College of Cardiology*, 43 (10): 1731-1737.
- AVMA. 2013. *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. American Veterinary Medical Association: Schaumburg.
- Aycicek, A., Varma, M., Ahmet, K., Abdurrahim, K., Erel, O. 2011. Maternal Active or Passive Smoking Causes Oxidative Stress in Placental Tissue. *Eur. J. Pediatr*, 170 (5): 645-651.
- Aydogan, U., Durmaz, E., Ercan, C.M., Eken, A., Ulutas, O.K., Kavuk, S., *et al*. Effect of Smoking During Pregnancy on DNA Damage and ROS Level Consequences in Maternal and Newborns' Blood, *Arv Hig Rada Toksikol*, 64 (1): 35-46.
- Banjarnahor, S.D.S. dan Artanti, N. 2014. Antioxidant properties of flavonoid. *Med J Indonesia*, 23 (4): 239-244.
- Bruchova, H., Vasikova, A., Merkerova, M., Milcova, A., Topinka, J., dan Balascak, I. 2010. Effect of Maternal Tobacco Smoke Exposure on the Placental Transcriptome. *Plasenta*, Pages 186-191.
- Burton, G.J. dan Jauniaux, E. 2011. Oxidative Stress. *Best Practice and Research Clinical Obstetric and Gynecology*, 25 (3): 287-299.
- Byers, S.L., Michael, V.W., dan Wiles, V., Dunn, S.L., Taft, R.A. 2012. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images, 7 (4): 1-5.

- Charan, J dan Kantharia, N.D. 2013. How to calculate sample size in animal studies. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4 (4): 303-306.
- Chelchowska, M., Ambroszkiewicz, J., Gajewska, J., Klita, T.S., dan Leibschang, J. 2011. The Effect of Tobacco Smoking During Pregnancy on Plasma Oxidant and Antioxidant Status in Mother and Newborn. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 155 (2): 132-136.
- Cho, E.J., Lee, Y.A., Yoo, H.H., dan Yokozawa T. 2006. Protective Effects of Broccoli (*Brassica oleracea*) Againsts Oxidative Damage in Vitro and in Vivo. *Journal Nutritional Science Vitamino*, 52 (6): 437-444.
- Chesnut, D.H., Wong, C.A., Tsen, L.C., Kee, W.D.N., Beilin, Y., dan Mhyre, J. 2014. *Chestnut's Obstetric Anesthesia: Principles and Practic, Fifth editon*. Elsevier Saunders: Cina.
- Crimp, C.A. 2012. Gender Dependent Mechanism of Alpha Tocopherol Protection from Benzo [a] pyrene Exposure in Rats.
- Dahlan, M.S. 2015. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat Dilengkapi dengan Menggunakan SPSS*. Epidemiologi Indonesia: Jakarta.
- Dalimartha, S dan Adrian, F. 2013. *Fakta Ilmiah Buah dan Sayur*. Penebar Plus: Jakarta.
- Eberhardt, M.K. 2001. *Reactive Oxygen Metabolites*. CRC Press: Washington DC.
- El-Ardat, M.A., Izetbegovic, S., El-Ardat, K.A.A. 2014. Effect of Cigarette Smoking in Pregnancy on Infants Antropometric Characteristics. *Mater Sociomed*, 26 (3): 186-187.
- El-Bahr, S.M. 2013. Biochemistry of free radicals and oxidative stress. *Science International*, 1 (5): 111-117.
- Ekambaram, G., Kumar, K.S., dan Joseph, L.D. 2017. *Comparative Study On The Estimation of Estrous Cycle in Mice by Visual and Vaginal Lavage Method*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(1): 5-7.

- Estina. 2010. Jenis dan Ciri-Ciri Tikus Laboratorium Disertai Gambar. (Online). (<https://dokterternak.wordpress.com/2010/11/05/jenis-dan-ciri-ciri-tikus-laboratorium-disertai-gambar/>, diakses 28 Juli 2018).
- Fitria, Triandhini, R.I.N.K., Mangimbulude, J.C., dan Karwur, F.F. 2013. Merokok dan Oksidasi DNA. *Sains Medika*, 5 (2): 113-120.
- Gaccioli, F. dan Lager, S. 2016. Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. Alex M (Ed), Dopico, *Frontier in Physiology*, 7 (40): 1-8.
- Gad, N. dan El-moez, M.R.A. 2011. Broccoli growth , yield quantity and quality as affected by cobalt nutrition. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2 (2): 226-231.
- Grotto, D., Maria, L.S., Valentini, J., Paniz, C., dan Garcia, G.S.S.C. 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, 32 (1): 169-174.
- Gubory, K.H., Fowler, P.A., dan Garrel, C. 2010. The Roles of Cellular Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Antioxidants in Pregnancy Outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42: 1634-1650.
- Halliwel, B. dan Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th Ed. Oxford University Press Inc.
- Hamdi, Y., Madfai, H., Belhareth, R., Mokni, M., Kouki, O.M., dan Amri M. 2016. Prenatal Exposure to Cigarette Smoke Enhances Oxidative Stress in Astrocytes of Neonatal Rat. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26 (4): 231-237.
- Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usma, L.A., Ameen, O.M., dan Lawal, A. 2010. Antioxidants: Its Medicinal and Pharmacological Applications. *African Journal Pure Applied Chemistry*, 4 (8): 142-151.

- Hamid, H.Y dan Zakaria, A.B. 2013. Reproductive Characteristics of the Female Laboratory Rat. *African Journal of Biotechnology*, 12 (19): 2510-2514.
- Haris, A., Ikhsan, M., dan Rogayah, R. 2012. *Asap Rokok Sebagai Bahan Pencemar Dalam Lingkungan*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 39 (1): 17-24.
- Jain, A., Agrawal, B.K., Varma, M., dan Jadhav, A.A. 2009. Antioxidant Statua And Smoking Habits: Relationship With Diet. *Singapore Med J*, 50(6): 624-627.
- Jauniaux, E. dan Burton, G.J. 2007. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early Human Development*, 83 (11): 699–706.
- Jaya,M. 2009. *Pembunuh Berbahaya Itu Bernama Rokok*. Riz'ma: Yogyakarta.
- Jo, J.S., Bhandari, A.R., Kang, G.H., dan Lee, J.G. 2016. Comparative Analysis of Individual Glucosinolates, Phytochemicals, and Antioxidant Activities in Broccoli Breeding Lines. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57 (4): 392-403.
- Kahnamoei, R., Maleki, F., dan Nasirzadeh,M.R. 2014. The effects of cigarette smoking on plasma mda and tac in university students. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 4 (3): 329–333.
- Kaur, C., Kumar, K., Anil, D., dan Kapoor, H.C. 2007. Variations In Antioxidant Activity In Broccoli (*Brassica oleracea L*) Cultivars. *Journal of Food Biochemistry*, 31: 621–638.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.2015. *Perilaku Merokok Masyarakat Indonesia*. Kementrian Kesehatan RI: Jakarta.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Merokok, Tak Ada UntungBanyak Sengsaranya*. Biro Komunikasi dan Pelayanan MasyarakatKementrian Kesehatan RI: Jakarta.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. Riset Kesehatan Dasar(Riskesdas) Tahun 2013.Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementrian Kesehatan RI: Jakarta.

- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Perilaku Merokok Masyarakat Indonesia (Hari Tanpa Tembakau Sedunia)*, Info Datin, ISSN 2442-7659.
- Knopik, V.S., Maccani, M.A., Francazio, S., dan McGeary, J.E. 2012. The Epigenetics of Maternal Cigarette Smoking During Pregnancy and Effects on Child Development. *Dev Psychopathol*, 24 (4): 1377–1390.
- Kramarova, D., Altangerel, B., Lazarkova, Z., dan Vondruska, M. 2009. Determination Of Heavy Metals And Nutrition Values In Broccoli. *Ecological Chemistry and Engineering A*, 16 (12): 1585-1590.
- Krisnadi, A.D. 2015. *Kelor Super Nutrisi*. Moringa Indonesia. Pusat Informasi dan Pengembangan Tanaman Kelor Indonesia: Blora.
- Kumar, S. dan Pandey A.K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. K. P. Lu and J. Sastre (Eds). *The Scientific World Journal*, p. 1-17.
- Kumar, C.K.A., Tejasri, M., Kumar, D.S., Ramya, M., Revathi, K., dan Reddy, G.A.K. 2012. A Review On Antioxidants. *International Journal of Innovative Drug Discovery*, 2 (2): 98-114.
- Latte, K.P., Appel, K., dan Lampen, A. 2011. Health benefits and Possible Risks of Broccoli – An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (12): 3287–3309.
- Lie, W., Wu, Y., Liu, X., Yan, C., Liu, D., Pan, Y., et al. 2013. Antioxidant Properties of Cis-ZZ'-3,7a', 7a,3a'-dihydroxy-ligustilide on Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Vitro. *Molecules*. ISSN 1420-3049.
- Lingga, L. 2010. *Cerdas Memilih Sayuran*. PT Agro Media Pustaka: Jakarta.
- Liu, H., Guo, X., Chu, Y., dan Lu, S. 2014. Heart Protective Effects and Mechanism of Quercetin Preconditioning on Antimycardial Ischemia Reperfusion (IR) Injuries in Rats. *Gene*, 545(1): 149-155.
- Llurba, E., Grataco, E., Galla, M.P., Caberol, dan Dominguez, C. 2004. A Comprehensive Study of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Preeclampsia and Normal Pregnancy. *Free Radical Biology & Medicine*, 37 (4): 557-570.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., dan Chandra, N. 2010. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy reviews*, 4 (8): 118-126.
- Lutfita, D.R. 2012. *Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kandungan Flavanoid Total dan Aktivitas Antioksidan Brokoli (Brassica oleracea L. cv. Group Broccoli)*. Tugas Akhir. Diterbitkan, Fakultas MIPA Universitas Islam Bandung, Bandung.
- Lutfiyati, H., Yuliasuti, F., Hidayat, I., Pribadi, P., dan Pradani, M.P.K. 2017. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Brokoli (Brassica Oleracea L Var Italica). *Proceeding 6th University Research Colloquium Universitas Muhammadiyah Magelang*, ISSN 2407-9189.
- Mahdu dan Kochhar, A. 2014. Proximate Composition, Available Carbohydrates, Dietary Fibre and Anti-Nutritional Factors of Broccoli (Brassica oleracea var. Italica plena) Leaf and Floret Powder. *Biosci Disc*, 5(1): 45-49.
- Mattsson, K. 2015. Maternal Smoking During Pregnancy, Long-term Health Effects in the Offspring. *Doctoral Dissertation*, Lund University, Swedia.
- Megasari, M., Triana, A., Andriyani, R., Ardhiyanti, Y., dan Damayanti, I.P. 2015. *Panduan Belajar Asuhan Kebidanan I*. Deepublish: Jakarta.
- Meziane, H., Ouagazzal, A.M., Aubert, L., Wietrzyk, M., dan Krezel, W. 2007. Estrous Cycle Effects on Behavior of C57BL/6J and BALB/c by female Mice: Implications for Phenotyping Strategies. *Gene, Brain and Behavior*, 6 (2), 192-200.
- Muchtadi, D. 2013. *Antioksidan dan Kiat Sehat di Usia Produktif*. Alfabeta: Bandung.
- Nalley, W.M.R., Handarini., Rizal, M., Arifianti, R.I., Yusuf, T.I., dan Purwantana, B. 2011. Determinan of The Estrous Cycle Based on Vaginal Cytology and Hormon Profil in Timor Hind. *Journal Veteriner*, 12 (2): 98-106.
- Nelawati, A., Soemardini., dan Prijadi, B. 2016. Pengaruh Pemberian Vitamin E Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Bunting yang Dipapar Asap Rokok

Subakut terhadap Berat Badan Bayi Lahir Aterm. *Majalah Kesehatan FKUB*, 3 (2): 76-85.

Niki, E. 2009. Lipid Peroxidation: Physiological Levels and Dual Biological Effects. *Free Radicals Biology and Medicine*, 47 (5): 469-484.

Notoadmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Rineka Cipta: Jakarta.

Nursyah, D.A. 2012. *Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (Rattus norvegicus) Ovariektomi yang Diberi Tepung Daging Teripang (Holothuria Scabra)*. Skripsi. Diterbitkan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Panche, A.N., Diwan, A.D., dan Chandra, S.R. 2016. Flavonoid: an Overview. *Journal of Nutritional Science*, 5 (47): 1-15.

Polipoch, S. dan Koomhin, P. 2015. Oxidative Stress-Associated Pathology: A Review (Patologi berkaitan Tekanan Oksidatif: Suatu Kajian). *Sains Malaysiana*, 44 (10): 1441-1451.

Porter, Y. 2012. Antioxidant properties of green broccoli and purple-sprouting broccoli under different cooking conditions. *Bioscience Horizons*, 5, 1-11.

Powers, S.K. dan Jacson, M.J. 2008. Exercise Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Journal Physiological Review*, 88: 1243-1276.

Prochazkova, D., Bousova, I., dan Wilhelmova, N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapi*, 82 (4): 513-523.

Ramayulis, R. 2015. *Green Smoothie Ala Rita Ramayulis*. PT. Gramedia Pustaka Utama: Jakarta.

Reece, S., Morgan, C., Parascandola, M., dan Siddiqi, K. 2018. Secondhand smoke exposure during pregnancy: a cross-sectional analysis of data from Demographic and Health Survey from 30 low-income and middle-income countries. *British Medical Journal*, p. 1-7.

- Rezaezadeh, A., Zuki, A.B.Z., Abdollahi, M., Goh, Y.M., Noordin, M.M., Hamid, M., *et al.* 2011. Determination of Oxidant Activity in Methanolic and Cloroformic Extracts of Momordica Charantia. *African Journal of Biotechnology*, 10 (24): 4932-4940.
- Rodrigo, R.A.T. 2009. *Oxidative Stress and Antioxidant: Their Role in Human Disease*. Nova Science Publisher: New York.
- Rumbold, A., Duley, L., Crowther, C.A., & Haslam, R.R. 2012. Antioxidant for preventing pre-eclampsia (Review). *The Cochrane Collaboration*, 6: 175-189.
- Sangupta, P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4 (6): 624-630.
- Saikumar, P., Jaya, B., dan Devi, M.R. 2013. Oxidative Stress in Pregnancy. *Journal of Dental and Medical Science*, 3 (6): 12-13.
- Sargowo, Djanggang. 2015. *Disfungsi endotel*. Universitas Brawijaya Press: Malang.
- Sholikhah, A.M., Wirjatmadi, B., dan Adrian, M. 2018. Effects of Purple Sweet Potatoes on Oxidative Stress Biomarkers in Rats Subjected to Exhaustive Exercise. *Humanistic Network for Science and Technology*, 2 (2): 174-177.
- Sielma, D.F., Sakinah, E.N., dan Nurdian, Y. 2016. Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) terhadap Kadar Malondialdehid Hepar Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA. *Jurnal Pustaka Kesehatan*, 4 (3): 449-453.
- Simbolon, S.E.B., Durry, M., dan Lintong, P. 2013. Gambaran Histopatologi Plasenta Pada Kehamilan dengan Preeklamsia. *Jurnal e-Biomedik*, 1 (2): 1069-1074.
- Smith, L. 2018. *What can go wrong with the placenta during pregnancy?*. (Online). (<https://www.medicalnewstoday.com/articles/309618.php>, diakses 24 Juli 2018).

Subakir, S.B., Santosa, D.I.S., dan Arleni. 2008. Kadar MDA dan HSP 70 pada Plasenta Penderita Preeklamsia. *Makara, Kesehatan*, 12 (92): 92-94.

Suryohudoyo, P. 2007. *Kapita Selekta: Ilmu Kedokteran Molekuler*. Sagung Seto: Jakarta.

Syamsuddin dan Darmono. 2011. *Farmakologi Eksperimental*. Universitas Indonesia Press: Jakarta.

Tincani, A., Nalli, C., Reggia, R., Zatti, S., dan Lojcono, A. 2017. Obstetric Manifestations of the Antiphospholipid Syndrome. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*, 12, p.107-120.

Tsikas, D. 2016. Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (MDA) and Relatives in Biological Samples: Analytical and Biological Challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13-30.

Umami, R.M. 2010. Perencanaan dan Pembuatan Alat Pengendali Asap Rokok Berbasis Mikrokontroler AT89S8252. *Jurnal Neutrino*, 2 (2): 155-163.

Vania, D., Basyar, E., dan Soeharti, C. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Brokoli (*Brassica Oleracea*) Terhadap Histopatologi Aorta Tikus Wistar Hiperlipidemia, *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 8 (1): 121-132.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., dan Fiotakis, A. 2009. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis, and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6 (2): 445-462.

Vasanthi, R.H., Mukherjee, S., dan Das, K.D. 2009. Potential Health Benefits of Broccoli. *Achemico-Biological Overview Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 9: (6): 749-759.

Wang, Y. dan Zhao S. 2010. *Vascular Biology of the Placenta*. Morgan & Claypool Publishers: USA.

Wardani, R.N., Sakinah, E.N., dan Nurdian, Y. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea*) terhadap Kadar SGOT dan

SGPT Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*, 4 (2): 196-199.

WHO. 2013. *WHO recommendations for the prevention and management of tobacco use and second-hand smoke exposure in pregnancy*. (Online). (http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/94555/9789241506076_eng.pdf;jsessionid=82804E8DD26D046D4EC3A4A75D78A945?sequence=1, diakses 22 Juli 2018).

WHO. 2016. Tobacco Fact sheet N^o 339. (Online). (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>, diakses 19 Juli 2018).

WHO. 2018. *WHO Global Report On Trends In Prevalence Of Tobacco Smoking 2000-2025, second edition*. (Online). (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272694/9789241514170-eng.pdf?ua=1>, diakses tanggal 20 Juli 2018).

Widiartini W., Siswati E., Setiyawati A., Rohmah I.M., Prasetyo E. 2013. *Pengembangan Usaha Produksi Tikus Putih (Rattus norvegicus) Tersertifikasi Dalam Upaya Memenuhi Kebutuhan Hewan Laboratorium*. (Online). (<http://artikel.dikti.go.id/index.php/PKMK/article/download/149/150>, diakses 4 Agustus 2018).

Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Kanisius: Yogyakarta.

Winarsi, H. 2011. *Radikal Bebas dan Antioksidan*. Kanisius: Yogyakarta.

Winarsi, H., Yuniati, A., dan Purwanto, A. 2013. Deteksi Aging pada Perempuan Berdasarkan Status Antioksidan. *Majalah Kedokteran Bandung*, 45 (3): 141-146.

Lampiran 1

Surat Kelaikan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 21 / EC / KEPK – S1 – KB / 01 / 2019

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA,
SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN,
DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Pengaruh Pemberian Ekstrak Brokoli (*Brassica Oleracea*) terhadap Kadar Hemoglobin, Berat Plasenta, Kadar SOD dan Kadar MDA Plasenta pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Bunting dan Malformasi Kongenital pada Janin Tikus Wistar Yang Dipapar Asap Rokok.

PENELITI : Mutiara Pertiwi
Fitry Rahmawati Syamsudin
Yuliani Rohmawati
Ema Kumala Ningrum
Safira Naafi Umamah

UNIT / LEMBAGA : S1 Kebidanan – Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjud ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
NIPK. 20180246051611001

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy.
Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 2

Kadar MDA Plasenta Tikus (*Rattus norvegicus*)

No	Kelompok	Abs MDA 532 nm	Kadar MDA Plasenta (ng/100 mg)
1	K (-)	0,102	0,244
2	K (-)	0,102	0,244
3	K (-)	0,08	0,172
4	K (-)	0,064	0,119
5	K (+)	0,401	1,229
6	K (+)	0,32	0,962
7	K (+)	0,478	1,483
8	K (+)	0,482	1,496
9	P1	0,232	0,672
10	P1	0,244	0,712
11	P1	0,236	0,685
12	P1	0,257	0,755
13	P2	0,199	0,564
14	P2	0,205	0,583
15	P2	0,183	0,511
16	P2	0,192	0,541
17	P3	0,182	0,508
18	P3	0,17	0,468
19	P3	0,081	0,175
20	P3	0,11	0,270

Lampiran 3

Hasil Uji Normalitas Data, Uji Homogenitas Varian dan Uji ANOVA

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MDA	,161	20	,188	,967	20	,699

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

MDA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K Neg	4	.1947	.06085	.03042	.0979	.2916	.12	.24
K Pos	4	1.2925	.25230	.12615	.8910	1.6940	.96	1.50
P1	4	.7060	.03667	.01833	.6477	.7643	.67	.76
P2	4	.5498	.03102	.01551	.5004	.5991	.51	.58
P3	4	.3553	.15896	.07948	.1023	.6082	.18	.51
Total	20	.6196	.40697	.09100	.4292	.8101	.12	1.50

Test of Homogeneity of Variances

MDA

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
2,092	4	15	,133

ANOVA

MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.862	4	.716	37.686	.000
Within Groups	.285	15	.019		
Total	3.147	19			

Lampiran 4

Hasil Uji Tukey-HSD dan Uji Korelasi *Pearson*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDA

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K Neg	K Pos	-1.0978*	.09743	.000	-1.3986	-.7969
	P1	-.5113*	.09743	.001	-.8121	-.2104
	P2	-.3550*	.09743	.017	-.6559	-.0541
	P3	-.1605	.09743	.492	-.4614	.1404
K Pos	K Neg	1.0978*	.09743	.000	.7969	1.3986
	P1	.5865*	.09743	.000	.2856	.8874
	P2	.7428*	.09743	.000	.4419	1.0436
	P3	.9373*	.09743	.000	.6364	1.2381
P1	K Neg	.5113*	.09743	.001	.2104	.8121
	K Pos	-.5865*	.09743	.000	-.8874	-.2856
	P2	.1563	.09743	.517	-.1446	.4571
	P3	.3507*	.09743	.019	.0499	.6516
P2	K Neg	.3550*	.09743	.017	.0541	.6559
	K Pos	-.7428*	.09743	.000	-1.0436	-.4419
	P1	-.1563	.09743	.517	-.4571	.1446
	P3	.1945	.09743	.314	-.1064	.4954
P3	K Neg	.1605	.09743	.492	-.1404	.4614
	K Pos	-.9373*	.09743	.000	-1.2381	-.6364
	P1	-.3507*	.09743	.019	-.6516	-.0499
	P2	-.1945	.09743	.314	-.4954	.1064

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

MDA

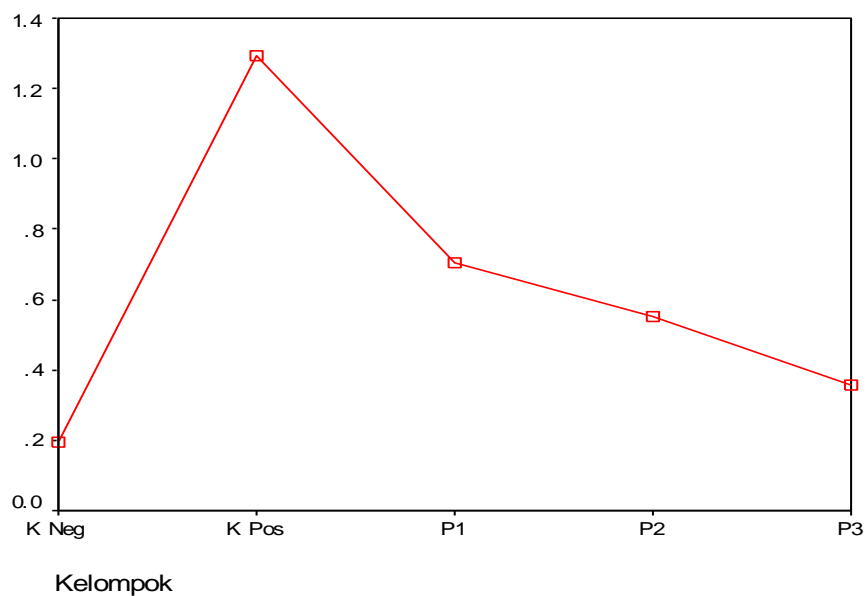
Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
K Neg	4	.1947			
P3	4	.3553	.3553		
P2	4		.5498	.5498	
P1	4			.7060	
K Pos	4				1.2925
Sig.		.492	.314	.517	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Means Plots



Correlations

		Kelompok	MDA
Kelompok	Pearson Correlation	1	-.888**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	16	16
MDA	Pearson Correlation	-.888**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	16	16

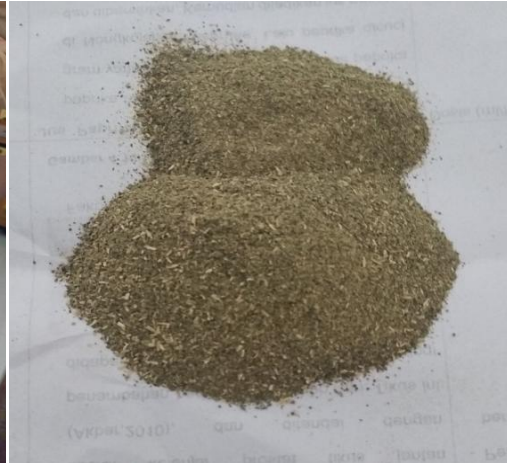
** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 5

Pembuatan dan Pengenceran Ekstrak Etanol Brokoli



Penimbangan Serbuk Brokoli



Serbuk Brokoli 100 gram



Direndam dengan Etanol 96%



Proses Pengocokan



Penyaringan dengan Kertas Saring



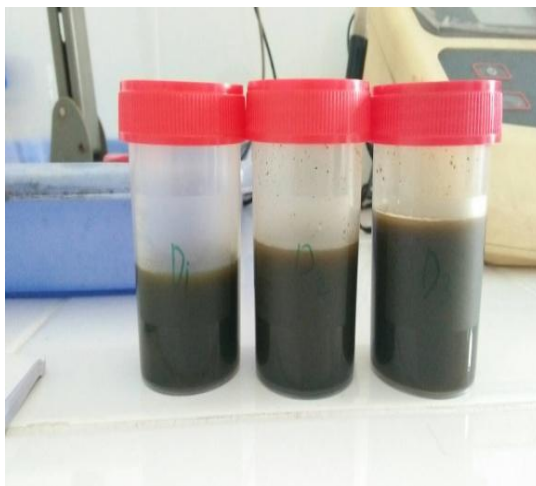
Proses Evaporasi



Pengovenan Hasil Ekstrak



Proses Pengenceran



Sediaan Ekstrak

Lampiran 6

Pemeliharaan dan Pengawinan Hewan Coba



Kandang Tikus



Penimbangan Berat Badan Tikus



Pemberian Pakan Tikus



Pengawinan Tikus



Penggantian Sekam



Palpasi Tikus

Lampiran 7

Pemberian Ekstrak Etanol Brokoli dan Pemaparan Asap Rokok



Penyondean Ekstrak Etanol Brokoli



Pemaparan Asap Rokok

Lampiran 8

Pembedahan Hewan Coba



Injeksi Ketamin



Pembedahan Tikus



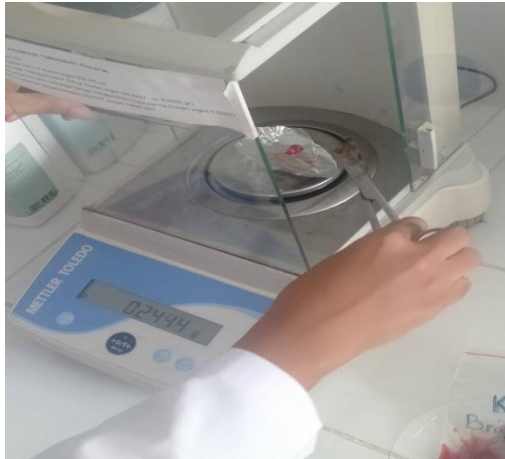
Pembersihan Plasenta dengan PBS



Plasenta Setelah Dibersihkan

Lampiran 9

Pengukuran Kadar MDA Plasenta



Penimbangan Plasenta



Penggerusan Plasenta



Bahan Pengukuran MDA



Penambahan TCA 15%



Tabung Berisi Supernatant Plasenta



Spektrofotometer